

Université de Sherbrooke

**L'intégrine $\alpha 7 X 2 B \beta 1$, un nouveau régulateur de la différenciation terminale
des cellules absorbantes de l'intestin humain**

Par
Amira SELTANA
Programmes d'anatomie et de biologie cellulaire

Thèse présentée à la Faculté de médecine et des sciences de la santé
en vue de l'obtention du grade de philosophiae doctor (Ph.D.)
en anatomie et biologie cellulaire

Sherbrooke, Québec, Canada
[Aout, 2014]

Membres du jury d'évaluation
[Pr Jean-François Beaulieu, anatomie et biologie cellulaire]
[Pr Pierre-Henri Vachon, anatomie et biologie cellulaire]
[Pr Ahmed Chraïbi, Physiologie et biophysique]
[Pr Lucie Germain, LOEX, Hôpital du St-Sacrement, Université Laval]

© [Amira SELTANA, 2014]

*À mes parents Hamadi & Aziza
À mon mari Mehdi et à mon fils Adam*

*Pourquoi craindrais-je d'avancer dans les ténèbres?
Je suis une flûte dont les sons jamais ne cesseront.
Je vivrai malgré la maladie qui me ronge
Et les ennemis qui m'assaillent.
Semblable à l'aigle par-dessus les hauts sommets.
Je regarderai amoureux le soleil lumineux,
Me riant des nuages, des pluies et des orages
...
Je dirai au destin qui s'acharne à combattre
Mes espérances par mille épreuves
Ni les vagues du désespoir,
Ni les malheurs soufflants en tempête
N'éteindront les flammes
Qui circulent dans mes veines.*

Abou el Kacem Chebbi

RÉSUMÉ

L'intégrine $\alpha 7X2B\beta 1$, un nouveau régulateur de la différenciation terminale des cellules absorbantes de l'intestin humain

Par

Amira SELTANA

Programmes d'anatomie et de biologie cellulaire

Thèse présentée à la Faculté de médecine et des sciences de la santé en vue de l'obtention du diplôme de philosophiae doctor (Ph.D.) en anatomie et biologie cellulaire, Faculté de médecine et des sciences de la santé, Université de Sherbrooke, Sherbrooke, Québec, Canada, J1H 5N4

Les échanges et les interactions spécifiques entre les cellules et leurs milieux environnants déterminent leurs comportements ainsi que leurs attributions au sein des tissus. Les intégrines, une famille de récepteurs transmembranaires, sont activement impliquées dans le contrôle de plusieurs fonctions cellulaires. D'abord, en tant que molécules d'adhésions, les intégrines connectent les cellules à leurs matrices extracellulaires. Cette connexion implique les intégrines d'une part, dans une signalisation bidirectionnelle à travers la membrane plasmique et d'autre part, dans l'assemblage et le remodelage du cytosquelette. L'intégrine $\alpha 7\beta 1$ s'est fait octroyée la régulation de plusieurs fonctions cellulaires, telles que l'adhésion, la migration, la prolifération et la différenciation des myoblastes au niveau du muscle squelettique. Dans l'intestin humain, l'intégrine $\alpha 7X2B\beta 1$ est principalement associée à la jonction crypte/villosité et son expression coïncide avec l'acquisition des caractéristiques de la différenciation entérocytaire. Nous nous sommes intéressés à déterminer le rôle de l'intégrine $\alpha 7X2B\beta 1$ dans la régulation des fonctions cellulaires intestinales, notamment la différenciation des cellules épithéliales intestinales. Nous montrons que l'inhibition ou l'expression forcée de l'intégrine $\alpha 7X2B\beta 1$ dans des cellules Caco-2/15, affecte globalement le processus de la différenciation entérocytaire. En effet, la caractérisation biochimique des cellules Caco-2/15 sh $\alpha 7B$ montre l'expression de niveaux particulièrement élevés des marqueurs globaux de la différenciation, en particulier ceux de la sucrase- isomaltase (SI). De même, l'étude en microscopie des cellules Caco-2/15 sh $\alpha 7B$ montre la présence de jonctions intercellulaires matures, d'une bordure en brosse bien développée, des niveaux d'expression très élevés de la SI et d'une grande uniformité de la monocouche cellulaire. Nous montrons aussi que l'inhibition de la sous-unité $\alpha 7B$ dans les cellules Caco-2/15 induit une baisse d'activité de la kinase Src et une baisse rapide de la triméthylation sur l'histone H3 du complexe polycomb PRC2. Nos résultats montrent une accélération du programme de la différenciation entérocytaire et nous permettent de conclure que l'intégrine $\alpha 7X2B\beta 1$ exerce une régulation négative sur la différenciation terminale des cellules au sein de l'épithélium intestinal. Au final, nous suggérons que les changements médiés par l'intégrine $\alpha 7X2B\beta 1$ englobent des facteurs et des mécanismes de régulation qui sont importants dans le processus général de la différenciation des cellules épithéliales intestinales. **Mots clés :** Intestin, Crypte/Villosité, Entérocytes, Intégrine $\alpha 7X2B\beta 1$, Différenciation, Src, H3K27me3.

TABLE DES MATIÈRES

| | |
|---|-----------|
| Résumé | |
| Table des matières | i |
| Liste des Figures | iv |
| Liste des tableaux | v |
| Liste des abréviations | vi |
| Introduction | 5 |
| 1.1 L'intestin humain | 5 |
| 1.1.1 L'intestin grêle | 5 |
| 1.1.1.1 La muqueuse intestinale | 6 |
| 1.1.1.2 L'axe crypte / villosité | 7 |
| 1.1.1.3 Les villosités intestinales | 8 |
| 1.1.1.4 Les cryptes intestinales | 9 |
| 1.1.1.5 Les complexes de jonctions intercellulaires | 11 |
| 1.1.1.6 Le développement de l'intestin grêle humain | 14 |
| 1.1.2 Le côlon | 14 |
| 1.2 La matrice extracellulaire | 16 |
| 1.2.1 La membrane basilaire intestinale | 16 |
| 1.2.1.1 Les Laminines | 19 |
| 1.3 Les intégrines | 22 |
| 1.3.2 Données structurales des intégrines | 22 |
| 1.3.2.1 Domaine extracellulaire | 22 |
| 1.3.2.2 Domaine transmembranaire | 25 |
| 1.3.2.3 Domaine cytoplasmique | 25 |
| 1.3.3 Données fonctionnelles des intégrines | 27 |
| 1.3.4 Expression des intégrines à Laminines au sein de l'unité fonctionnelle intestinale | 28 |
| 1.4 L'intégrine $\alpha 7 \beta 1$ | 30 |

| | |
|---|-----------|
| 1.5 La différenciation entérocytaire | 33 |
| 1.6 Les cellules Caco-2..... | 34 |
| 1.7 Objectifs de la thèse | 37 |
| Matériel et méthodes | 38 |
| 2.1 Culture cellulaire | 38 |
| 2.2 Génération des lignées shRNA | 38 |
| 2.3 Extraction protéique | 40 |
| 2.4 Immunobuvardage de type Western | 40 |
| 2.5 Extraction d'ARN | 42 |
| 2.6 RT-PCR..... | 42 |
| 2.7 RT-PCR quantitatif | 43 |
| 2.8 Immunofluorescence | 44 |
| 2.9 Courbes de prolifération..... | 45 |
| 2.10 Microscopie électronique | 45 |
| 2.11 Essais de transfection FuGENE | 45 |
| 2.12 Traitement aux inhibiteurs de signalisation | 46 |
| Résultats | 47 |
| 3.1 La perte d'expression de la sous-unité $\alpha 7B$ influence l'état de différenciation des cellules Caco-2/15..... | 47 |
| 3.2 La perte d'expression de la sous-unité $\alpha 7B$ s'associe à une accélération du programme de différenciation des cellules Caco-2/15..... | 50 |
| 3.3 Influence de la perte de la fonctionnalité de l'intégrine $\alpha 7B\beta 1$ sur la différenciation morphologique des cellules Caco-2/15..... | 52 |
| 3.3.1 Caractérisation des cellules Caco-2/15 $sh\alpha 7B$ en microscopie électronique à transmission..... | 52 |
| 3.3.2 Caractérisation des cellules Caco-2/15 $sh\alpha 7B$ en microscopie par immunofluorescence indirecte. | 53 |
| 3.4 Étude de la croissance des cellules Caco-2/15 $sh\alpha 7B$..... | 56 |
| 3.5 Expression de la variante extracellulaire $\alpha 7X2$ dans l'épithélium intestinal..... | 58 |

| | |
|--|------------|
| 3.6 Étude de l'impact d'une expression forcée de la sous-unité $\alpha 7B$ dans les cellules Caco-2/15 sh$\alpha 7B$..... | 59 |
| 3.7 Étude de la croissance des cellules Caco-2/15 sh$\alpha 7X2B$ | 62 |
| 3.8 La voie LKB1 est activée dans les cellules Caco-2/15 sh$\alpha 7B$..... | 64 |
| 3.9 La kinase Src est activée durant la différenciation entérocytaire | 66 |
| 3.10 L'activité de la kinase Src est sous-réglée dans les cellules Caco-2/15 sh$\alpha 7B$..... | 68 |
| 3.11 L'inhibition de l'expression de l'intégrine $\alpha 7B\beta 1$ corrèle avec une baisse d'activité du complexe de répression polycombs PRC2..... | 70 |
| Discussion | 72 |
| 4.1 L'impact d'une inhibition de l'intégrine $\alpha 7B\beta 1$ sur la biologie des cellules épithéliales intestinales | 72 |
| 4.2 Interactions de l'intégrine $\alpha 7B\beta 1$ avec la membrane basilaire intestinale..... | 78 |
| 4.2.1 Interaction de l'intégrine $\alpha 7B\beta 1$ avec les laminines | 78 |
| 4.2.2 Interaction de l'intégrine $\alpha 7B\beta 1$ avec la laminine-511 | 82 |
| 4.2.3 Interaction de l'intégrine $\alpha 7B\beta 1$ avec la laminine-521 | 83 |
| 4.3 Signalisations intracellulaires régulées par l'intégrine $\alpha 7B\beta 1$ | 85 |
| 4.3.1 Rôle de l'axe signalétique intégrine $\alpha 7B\beta 1$/Src dans la polarisation cellulaire..... | 87 |
| 4.3.2 Rôle de l'intégrine $\alpha 7B\beta 1$ dans la modulation de la signalisation d'ERK | 90 |
| 4.4 Conclusion finale..... | 92 |
| Remerciements..... | 95 |
| Liste des références | 96 |
| Annexes | 110 |

LISTE DES FIGURES

| | |
|--|----|
| Figure 1 : La paroi de l'intestin grêle..... | 7 |
| Figure 2 : L'axe crypte/villosité..... | 10 |
| Figure 3 : Représentation des complexes de jonctions intercellulaires..... | 13 |
| Figure 4 : Développement et caractéristiques de l'épithélium dans l'intestin humain..... | 15 |
| Figure 5 : La matrice extracellulaire..... | 18 |
| Figure 6 : Les laminines et leurs distributions dans l'axe crypte/villosité..... | 20 |
| Figure 7 : Les intégrines..... | 23 |
| Figure 8 : Conformations et structures des intégrines..... | 26 |
| Figure 9 : Distribution des intégrines au niveau de l'axe crypte/villosité..... | 29 |
| Figure 10 : Structure de l'intégrine $\alpha 7\beta 1$ | 32 |
| Figure 11 : Les atouts des cellules Caco-2..... | 36 |
| Figure 12 : Séquence shRNA spécifiques à la sous-unité intégrine $\alpha 7B$ | 39 |
| Figure 13 : Influence de l'inhibition de l'expression de la sous-unité $\alpha 7B$ sur l'état de différenciation des cellules Caco-2/15..... | 49 |
| Figure 14: La répression de la sous-unité $\alpha 7B$ accélère le processus de différenciation entérocytaire | 51 |
| Figure 15: Représentation de la microscopie électronique à transmission des cellules Caco-2/15 sh $\alpha 7B$ | 53 |
| Figure 16: Représentation de la microscopie par immunofluorescence indirecte des cellules Caco-2/15 sh $\alpha 7B$ | 55 |
| Figure 17: L'abolition de l'expression de la sous-unité $\alpha 7B$ dans les cellules Caco-2/15 n'affecte pas la prolifération cellulaire..... | 57 |
| Figure 18 : Expression de la variante extracellulaire $\alpha 7X2B$ dans l'épithélium de l'intestin humain..... | 59 |
| Figure 19: Caractérisation des cellules Caco-2/15 sh $\alpha 7X2B$ | 61 |
| Figure 20: La réexpression de la sous-unité $\alpha 7X2B$ dans les cellules Caco-2/15 sh $\alpha 7B$ n'affecte pas la croissance cellulaire..... | 63 |
| Figure 20: La voie LKB1 est activée dans les cellules Caco-2/15 sh $\alpha 7B$ | 65 |
| Figure 21: L'expression de la kinase Src (pSrc Y416) durant la différenciation des cellules Caco-2/15..... | 67 |
| Figure 22: Effet de l'inhibition de l'intégrine $\alpha 7B\beta 1$ sur l'activation des kinases Src dans les cellules Caco-2/15 | 69 |
| Figure 24: L'expression de PRC2 associée à la marque épigénétique (H3K27me3) dans cellules Caco2/15 sh $\alpha 7B$ | 71 |
| Figure 25 : Signalisations intracellulaires régulées par l'intégrine $\alpha 7B\beta 1$ | 94 |

LISTE DES TABLEAUX

| | |
|---|----|
| Tableau 1: La nomenclature des Laminines | 21 |
| Tableau 2: Constantes de dissociation de l'intégrine $\alpha 7 \beta 1$ pour les laminines | 32 |
| Tableau 3: Anticorps utilisés en immunobuvardage de type Western..... | 55 |
| Tableau 4: Séquences des amorces testées en PCR..... | 43 |
| Tableau 5: Anticorps utilisés dans les essais d'immunofluorescences | 44 |

LISTE DES ABRÉVIATIONS

| | |
|---------------------------------|--|
| BM | Membrane basilaire |
| CDX-2 | Caudal type homeobox 2 |
| CDK | Cycline dependant Kinase |
| DPPIV | Dipeptidyl peptidase |
| ERK1/2 | Extracellular signal-regulated kinase 1/2 |
| ES | Épithélium de surface |
| FA | Complexes d'adhésion focaux |
| FHL | Four and half LIM domain |
| HNF-1α | Hepatocyte nuclear factor 1 homeobox A |
| HNF-4α | Hepatocyte nuclear factor 4 homeobox A |
| H3K27me3 | trimétylation de la lysine 27 de l'histone 3 |
| JPC | Jours post confluence |
| LKB1 | Liver kinase B1 |
| MEC | Matrice extracellulaire |
| MAPK | Mitogen-activated protein kinase |
| Pi3K | Phosphatidylinositide 3-kinase |
| PRC2 | Complexe repressur polycomb de type 2 |
| PP2 | 4-amino-5-(4-chlorophenyl)-7-(t-butyl)pyrazolol[3,4d]pyrimidine) |
| pSrc^{y416} | Phosporylation de Src sur la Tyrosine 416 |
| ROS | Reactive oxygen species (dérivés réactifs de l'oxygène) |
| SI | Sucrase-Isomaltase |
| SUZ12 | Suppressor of Zeste 12 Homolog |
| ZA | Zonula adherens |
| ZO | Zonula occludens |

Introduction

1.1 L'intestin humain

L'intestin représente l'une des surfaces d'échange des plus larges de l'organisme et, qui chez l'humain, se développe relativement tôt au cours de l'ontogénèse. Sur un plan anatomique, la morphogénèse intestinale est un processus multiphasique. En effet, l'intestin primitif évolue et se spécialise avec la formation de segments intestinaux morphologiquement et fonctionnellement distincts. À la fin du développement, l'intestin est défini par deux grands segments fonctionnels : l'intestin grêle et le colon (Barker et al., 2008b; Menard, 2004; Menard and Beaulieu, 1994; Ménard et al., 2008).

1.1.1 L'intestin grêle

L'intestin grêle est le siège de la digestion d'aliments et de l'absorption des nutriments. Il assure le transfert d'une partie des molécules organiques, des sels et de l'eau provenant de l'alimentation vers le milieu intérieur où ces substances sont distribuées aux cellules via le système circulatoire. Ce dernier s'étend du pylore au colon et se subdivise en trois segments successifs distincts tant par leurs morphologies que par leurs fonctions: le duodénum, le jéjunum et l'iléon. La paroi de l'intestin grêle se compose, de la cavité abdominale vers la lumière, de quatre couches concentriques appelées : la séreuse, la musculaire, la sous-muqueuse et la muqueuse (Figure 1) (Barker et al., 2008b; Ménard et al., 2008).

1.1.1.1 La muqueuse intestinale

La muqueuse intestinale est constituée de trois couches tissulaires : l'épithélium, la lamina propria et la *muscularis mucosae*.

L'épithélium intestinal est contigu à la lumière intestinale et est composé d'une simple couche de cellules cylindriques intervenant dans la digestion et l'absorption des aliments.

La lamina propria, appelée aussi mésenchyme chez le fœtus et stroma chez l'adulte, est une couche de tissu conjonctif sur laquelle repose l'épithélium intestinal. Cette dernière est constituée de myofibroblastes, de fibroblastes, de composantes du système nerveux périphérique ainsi que de nombreux vaisseaux sanguins et lymphatiques. La lamina propria influence grandement les fonctions cellulaires de l'épithélium intestinal, tant par sa sécrétion de morphogènes que par sa contribution à la mise en place de la matrice extracellulaire (Andoh et al., 2007; Francoeur et al., 2008; Powell et al., 1999).

La *muscularis mucosae* est formée de fibres musculaires lisses qui permettent à la muqueuse d'avoir ses propres contractions et ce, de manière indépendante des mouvements de la paroi intestinale.

La face luminale de la muqueuse de l'intestin grêle est formée de nombreux replis et projections qui contribuent à augmenter considérablement la surface d'échange de l'intestin. Ces projections orientées vers la lumière intestinale sont appelées villosités. À la base de ces dernières se creusent des glandes qu'on nomme les cryptes de Lieberkhün. Chaque villosité intestinale est en moyenne entourée de six cryptes dont l'ensemble constitue l'unité fonctionnelle de l'intestin grêle : l'axe crypte/villosité (Baas et al., 2004; Bjerknes and Cheng, 2005; Menard and Beaulieu, 1994; Pageot et al., 2000). De plus, la muqueuse possède des valvules conniventes qui sont des replis circulaires permanents. Ces valvules sont surtout présentes dans la première partie du jéjunum (Figure 1).

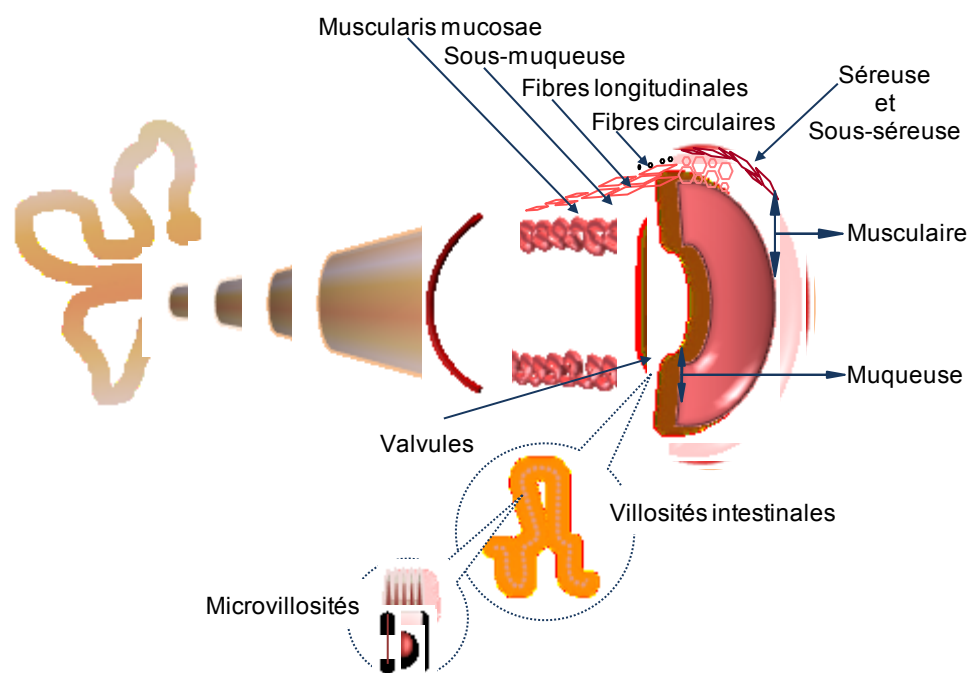


Figure 1 : la paroi de l'intestin grêle.

De la cavité abdominale vers la lumière, la paroi intestinale se compose de quatre couches concentriques appelées : la séreuse, la musculaire, la sous-muqueuse et la muqueuse. La séreuse est un tissu conjonctif de protection. La musculaire assure le tonus musculaire de l'intestin et est formée de cellules musculaires lisses disposées selon deux axes formant ainsi une couche circulaire interne et une couche longitudinale externe. La sous-muqueuse est un tissu conjonctif dense très vascularisé et associé à un réseau de nerfs sympathiques. La muqueuse est organisée en plis et replis qui augmentent considérablement sa surface. La surface de chaque pli est rehaussée par de milliers de structures microscopiques qui sont projetées vers la lumière intestinale et qui sont appelées villosités intestinales. Les villosités sont recouvertes d'un épithélium de revêtement simple composé majoritairement de cellules absorbantes possédant une bordure en brosse apicale garnie de microvillosités.

1.1.1.2 L'axe crypte / villosité

Dans cette unité fonctionnelle l'épithélium est défini par deux grands compartiments cellulaires distincts. D'une part, la crypte qui est principalement associée à un phénotype cellulaire prolifératif et d'autre part, la villosité qui représente le siège des cellules pleinement différenciées (Antonowicz et al.,

1974; Pageot et al., 2000). Dans l'axe crypte/villosité les processus de maintien de la population des cellules souches, de régénération, de différenciation, de migration et de mort cellulaire se répètent en continu et sont extrêmement bien coordonnés. Le maintien d'un tel équilibre permet d'assurer le renouvellement perpétuel de l'épithélium intestinal et, par ailleurs, sa rupture ouvre la porte à plusieurs maladies digestives graves (Blikslager et al., 2007; Blumberg et al., 2008; Sturm and Dignass, 2008; Teller and Beaulieu, 2001; Thompson et al., 2000) (Figure 2).

1.1.1.3 Les villosités intestinales

Le nombre et la taille des villosités de l'intestin grêle diminuent progressivement en direction du côlon, ce dernier étant caractérisé par une absence totale de ces structures. L'épithélium recouvrant les villosités est constitué de cellules polarisées par leurs structures et leurs fonctions. Trois principales classes d'entérocytes différenciés y ont été recensées : les cellules absorbantes, les cellules caliciformes ou les cellules à mucus et les entéroendocrines (Figure 2) (Hocker and Wiedenmann, 1998; Pageot et al., 2000).

Les cellules absorbantes représentent environ 90% de la population cellulaire totale des villosités intestinales. Elles sont liés entre eux par des jonctions serrées qui séparent physiquement leurs pôles apicaux et basolatéraux. Ces cellules sont essentiellement responsables de l'absorption et du transport adéquat des nutriments issus du bol alimentaire. La membrane plasmique du pôle apical des entérocytes est tapissée d'une multitude de microvillosités qui forment la bordure en brosse ou le plateau strié (Figure 2). Ce type de structure permet une optimisation de la surface d'échange dans le processus d'absorption intestinale. À ce niveau, la membrane cellulaire contient de nombreuses hydrolases qui assurent la digestion terminale des protéines et des glucides ingérés, ainsi que des systèmes de transport d'acides aminés et de monosaccharides. Parmi ces hydrolases ou encore enzymes digestives membranaires on retrouve notamment des disaccharidases (sucrase-isomaltase,

lactase,...), des peptidases et la phosphatase alcaline. Au pôle basolatéral, la membrane des cellules absorbantes matures présente de nombreux replis ou des inter-digitations (Bjerknes and Cheng, 2005; Chantret et al., 1988; Cheng and Leblond, 1974; Vachon and Beaulieu, 1992).

Les microvillosités de la bordure en brosse sont maintenues par des centres de filaments d'actine qui s'étendent jusqu'au cytoplasme apical des cellules. À ce niveau, l'ensemble forme un réseau dont la fonction est de stabiliser les microvillosités et d'assurer un mouvement en blocs de la surface épithéliale apicale. Différentes protéines sont impliquées afin d'assurer l'assemblage des filaments d'actine au cœur des microvillosités, notamment la villine et la fimbrine. Par ailleurs, la myosine permet d'enchâsser le centre de filaments d'actine à la membrane plasmique des microvillosités et l'ensemble donne à ces dernières plus de résistance et de rigidité. Les villosités et leurs microvillosités sont animées de lents mouvements qui permettent un brassage uniforme du contenu et augmentent le contact entre la muqueuse et les éléments du bol alimentaire (Powell et al., 1999) .

1.1.1.4 Les cryptes intestinales

Les cryptes intestinales (cryptes de Lieberkhün) s'ouvrent à la base des villosités. Au sein de cette structure, l'épithélium peut être subdivisé en trois zones distinctes: un tiers supérieur dont l'organisation est semblable à celle des villosités constituées de cellules pleinement différenciées, un tiers médian constitué de cellules prolifératives et en voie de différenciation et un tiers inférieur associé à un phénotype indifférencié et prolifératif (Bjerknes and Cheng, 2005; Cheng and Leblond, 1974). C'est aussi au niveau de la crypte que résident les cellules souches intestinales qui s'auto-renouvèlent et prolifèrent en continu (Bjerknes and Cheng, 2005; Scoville et al., 2008). Leurs descendances spécialisées suivent majoritairement un mouvement ascendant et hors de la crypte à l'exclusion des cellules de Paneth (Pageot et al., 2000; Porter et al., 2002). Ces dernières demeurent au fond des cryptes et elles sont associées à une fonction défensive contre les micro-organismes (Figure 2).

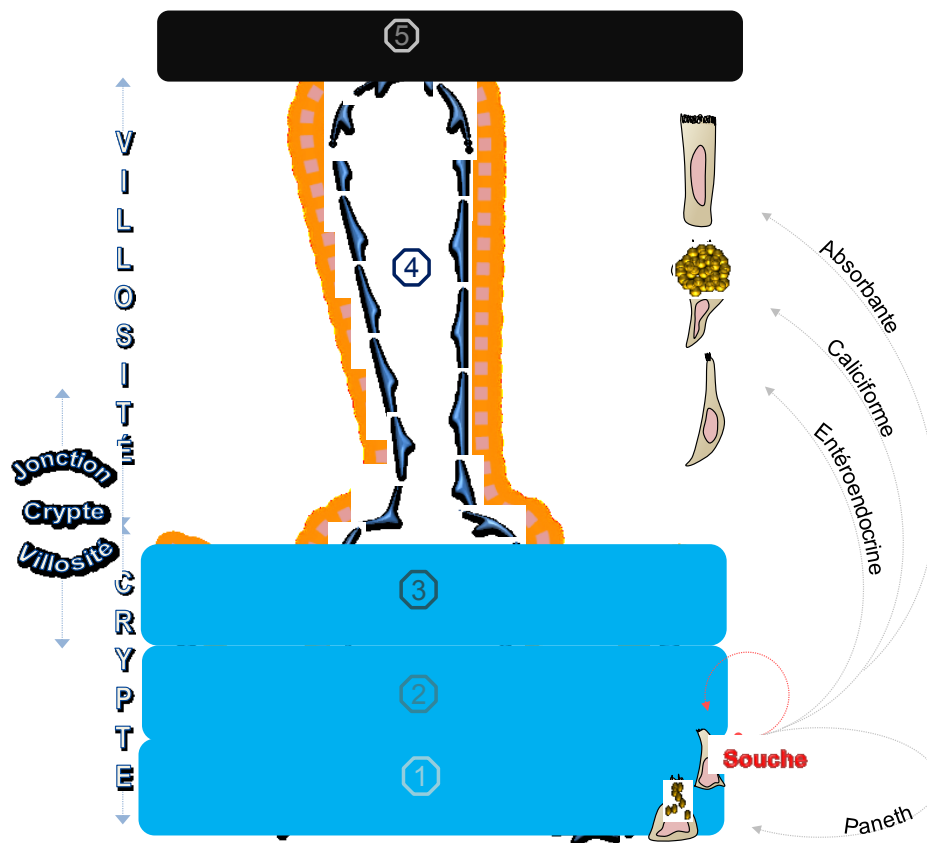


Figure 2 : L'axe crypte/villosité.

L'ensemble des deux structures crypte et villosité représente l'unité fonctionnelle de l'intestin grêle et elles sont tapissées d'un épithélium de revêtement en perpétuel renouvellement. Au sein de cette unité, les processus de maintien de la population des cellules souches, de régénération, de différenciation, de migration et de mort cellulaire se succèdent continuellement. Une ségrégation des cellules épithéliales définit chacune des structures de l'axe crypte/villosité. D'une part, la crypte est principalement associée à un phénotype cellulaire indifférencié et prolifératif (tiers inférieur (1)), prolifératif et en cours de spécialisation (tiers médian (2)) et à différenciation terminale (tiers supérieur (3)). D'autre part, la villosité représente le siège des cellules épithéliales pleinement différenciées (4). L'apex de la villosité (5) renferme des cellules apoptotiques qui sont desquamées selon un mouvement ascendant des cellules. Les cellules souches intestinales résident dans le tiers inférieur de la crypte (1). Elles s'auto-renouvèlent, prolifèrent en continu et se différencient en quatre classes cellulaires. Les cellules de Paneth qui demeurent dans le tiers inférieur de la crypte (1) et les cellules absorbantes, caliciformes et entéroendocrines qui suivent un mouvement ascendant vers la villosité (4).

1.1.1.5 Les complexes de jonctions intercellulaires

L'apparente simplicité du revêtement épithélial intestinal est trompeuse. En effet, au-delà de ses fonctions évidentes de digestion et d'absorption des nutriments et de l'eau essentielles à l'organisme, l'épithélium intestinal assure une importante fonction de barrière (Blumberg et al., 2008; Laukoetter et al., 2008). Ainsi, cette structure contrôle le flux ainsi que le transport transépithélial des ions, de l'eau et des nutriments (Clayburgh et al., 2004; Tsukita et al., 2001). En outre, il fait écran aux substances potentiellement toxiques et les empêche d'interférer dans les fonctions intestinales. Toutefois, les fonctions de l'épithélium intestinal dépendent particulièrement de l'action et de l'intégrité d'un ensemble de complexes de jonctions intercellulaires (Figure 3) (Vasioukhin and Fuchs, 2001).

Au sein de l'épithélium intestinal, les cellules sont attachées les unes aux autres, au niveau de leurs extrémités apicales, par trois grandes classes de jonctions: les serrées, les adhérentes et les desmosomes. Ces complexes de jonctions intercellulaires sont d'une part, responsables de la cohésion structurale de l'épithélium et d'autre part, elles définissent la morphologie et la polarisation des cellules épithéliales (Nelson, 2003; Thiery, 2003). Les plus superficielles d'entre-elles, sont les jonctions serrées ou zonula occludens (ZO) et elles ont la particularité d'établir une occlusion complète des espaces intercellulaires. Ces complexes de jonctions serrées sont décrits comme étant responsables de l'étanchéité de l'épithélium intestinal (Nusrat et al., 2000). Ces derniers sont formés d'une association de diverses protéines transmembranaires, telles que l'occludine, les claudines et les JAMs (Junctional Adhesion Molecules). Les complexes de jonctions serrées englobent aussi dans leur composition des protéines d'échafaudages intracellulaires, telles que les ZO-1/ -2/ -3 et des protéines de la plaque, telles que symplekin, cinguline et 7H6 (Balda and Matter, 2008; Denker and Nigam, 1998). Ce complexe de protéines interagit activement avec le cytosquelette d'actine et est entouré de nombreuses protéines régulatrices, telles que les MAPK, PKC, Pi3K et la phospholipase Cy. Ces protéines régulatrices font partie de différentes voies de signalisation

intracellulaires importantes dans la régulation des fonctions cellulaires intestinales (Matter and Balda, 2003; Stein and Kottra, 1997).

Dans l'ordre d'expression, les ceintures adhérentes ou zonula adherens (ZA) succèdent directement aux jonctions serrées au niveau de l'épithélium intestinal. Ces complexes de jonctions sont principalement formés de protéines transmembranaires, notamment les cadhérines (Nelson, 2003; Thiery, 2003). Ces dernières, par l'entremise de leurs domaines extracellulaires, fournissent l'outil initial au contact intercellulaire. Par ailleurs, elles s'attachent au cytosquelette d'actine via leurs queues cytoplasmiques ce qui, d'une part, permettra de structurer les interactions des cellules épithéliales entre elles et, d'autre part, d'assurer la cohésion de l'épithélium intestinal (Vasioukhin and Fuchs, 2001). Outre le rôle structural des jonctions adhérentes, elles ont été fortement impliquées dans le cheminement d'une multitude d'évènements de signalisation intracellulaire essentielle pour l'induction de la différenciation (Laprise et al., 2002; Laprise et al., 2004), l'arrêt du cycle cellulaire et le mouvement collectif des cellules épithéliales intestinales (Canel et al., 2010).

Les desmosomes ou macula adherens sont localisées dans les régions sous-jacentes aux jonctions adhérentes. À l'encontre des jonctions serrées et adhérentes, les desmosomes assurent la formation d'un réseau intercellulaire de cytokératines. Les réseaux de cytokératines participent à l'établissement de la cohésion architecturale de l'épithélium intestinal et assurent la transmission et l'amortissement des forces mécaniques auxquelles sont soumises les cellules épithéliales (Garrod, 1993).

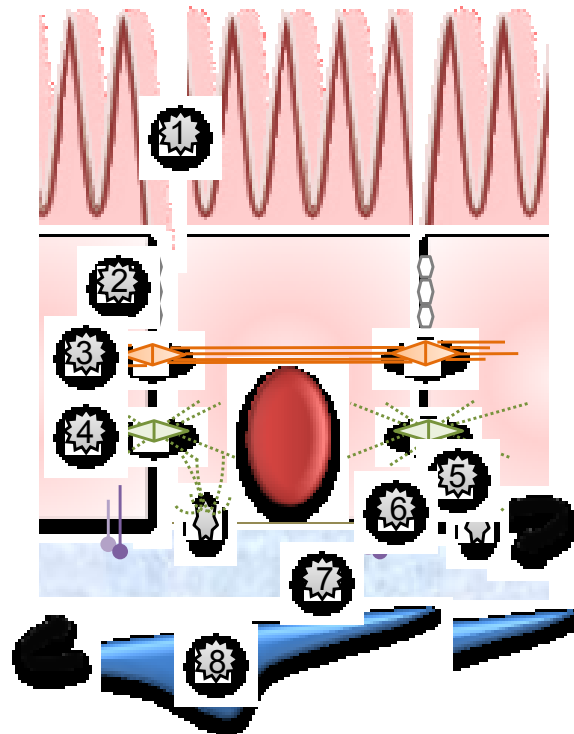


Figure 3 : Représentation des complexes de jonctions intercellulaires

L'épithélium intestinal est composé majoritairement de cellules absorbantes, polarisées qui comportent au niveau de leurs surfaces apicales des microvillosités (1) en forme de doigts projetés vers la lumière intestinale. L'intégrité de la couche épithéliale est maintenue grâce à différents complexes de jonctions intercellulaires. Les jonctions serrées (2) situées juste au-dessous des microvillosités, empêchent la diffusion de nombreuses substances à travers les espaces intercellulaires. Les jonctions adhérentes (3) et les desmosomes (4) relient le cytosquelette d'une cellule aux autres cellules. Les héli-desmosomes (5) et les récepteurs d'adhérence (6) se lient aux composants de la membrane basilaire (7) et peuvent induire des réarrangements du cytosquelette, activer des cascades de signalisations intracellulaires et moduler différentes fonctions cellulaires. La membrane basilaire cloisonne l'épithélium intestinal d'une couche cellulaire sous-épithéliale formée de myofibroblastes (8).

1.1.1.6 Le développement de l'intestin grêle humain

Chez l'homme, la maturité de l'intestin grêle est acquise graduellement au cours des premières semaines de gestation. À la 8^{ème} semaine de gestation, la paroi intestinale se résume en un simple tube recouvert d'un épithélium pluristratifié. À la 9^{ème} semaine, le mésenchyme infiltre les couches épithéliales de l'intestin proximal. Cet événement donne naissance aux villosités intestinales. À la fin de la 11/12^{ème} semaine, toute la surface de l'intestin grêle est tapissée par un épithélium simple à cellules cylindriques. Vers la 14^{ème} semaine, des glandes se creusent dans le mésenchyme et au niveau des espaces inter-villositaires, amenant à la formation des cryptes. À la mi-gestation, l'intestin grêle fœtal partage l'architecture et plusieurs des fonctionnalités de son analogue adulte et donc à ce stade, l'unité fonctionnelle d'absorption intestinale, appelée aussi l'axe crypte-villosité, est complètement établie au niveau de la muqueuse (Figure 4) (Menard and Beaulieu, 1994; Teller and Beaulieu, 2001).

1.1.2 Le côlon

Le côlon est le segment le plus distal dans l'intestin. Au cours du développement, le côlon immature se confond avec l'intestin grêle. Au-delà de la semaine 30 de gestation, le côlon se défait progressivement des propriétés qui le confondait jusque là à l'intestin grêle, par la désagrégation de ses structures villositaires et par la perte de l'expression d'hydrolases digestives spécifiques à la bordure en brosse des entérocytes. À la naissance, le colon mature aura acquis son architecture finale distinguée par un épithélium de surface plat qui débouche sur de longues glandes coloniques (Figure 4) (Menard and Beaulieu, 1994; Ménard et al., 2008; Teller and Beaulieu, 2001).

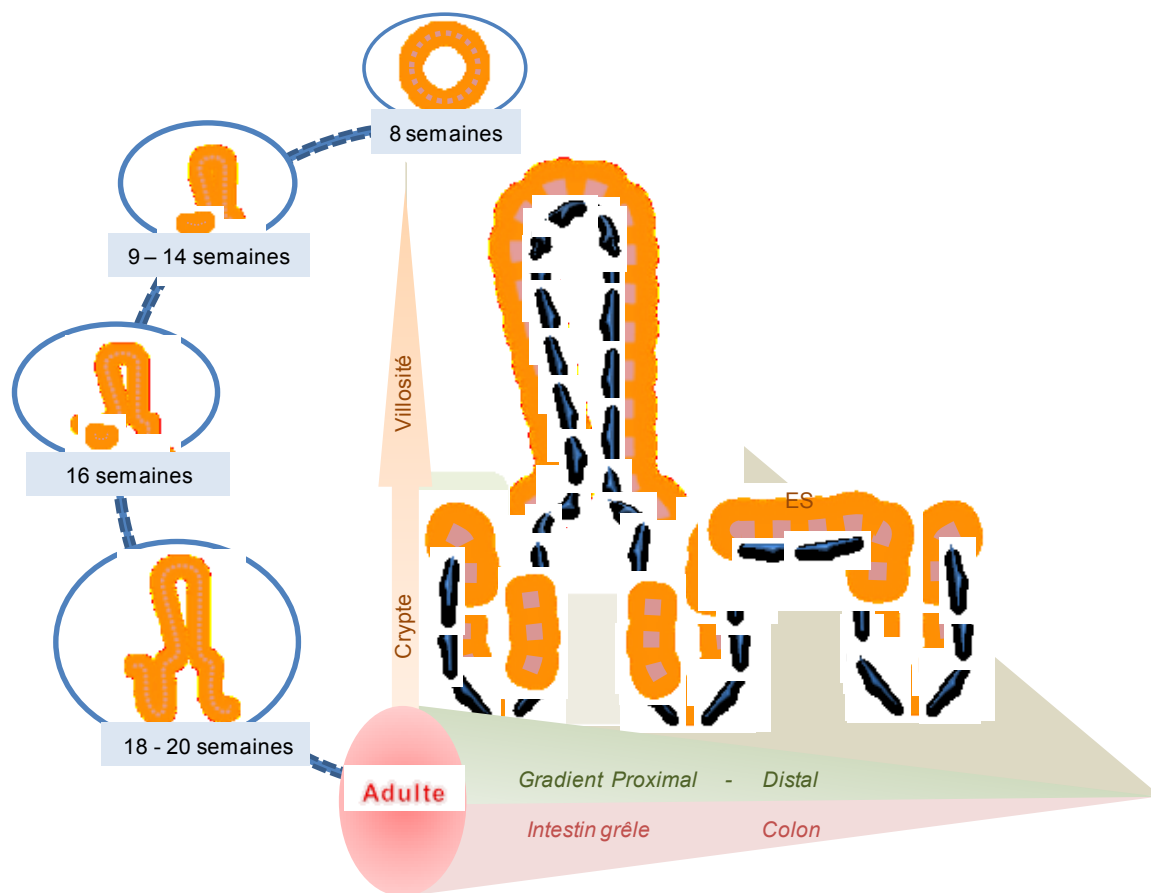


Figure 4 : Développement et caractéristiques de l'épithélium dans l'intestin humain.

L'intestin humain se développe au cours des premières semaines de gestation. Entre la 9^{ème} et la 14^{ème} semaine de gestation l'épithélium intestinal est monostratifié et organisé sous forme de villosités. Vers la 16^{ème} semaine de gestation les cryptes se creusent à la base des villosités et c'est aux alentours des 18-20^{ème} semaines que l'axe crypte-villosité est complètement établi au niveau de la muqueuse. Une architecture crypte/ villosité est transitoirement établie dans le colon en cours de développement et qui disparaît à la naissance pour laisser place à un épithélium de surface plat (ES) débouchant sur de longues glandes coloniques. Adapté de (Seltana et al., 2012)

1.2 La matrice extracellulaire

À l'exception des cellules sanguines, toutes les cellules de l'organisme demeurent ancrées au tissu dont elles font partie intégrante. Cette propriété est assurée par l'adhérence des cellules aux protéines de l'environnement extracellulaire, qui forment la matrice extracellulaire (MEC) (Figure 5). Les interactions entre les cellules et la matrice extracellulaire jouent un rôle important dans le contrôle du comportement cellulaire. Ce contrôle dépend essentiellement des interactions spécifiques entre les molécules matricielles et les cellules par le biais de récepteurs transmembranaires, notamment ceux appartenant à la famille des intégrines. Ces interactions permettent à la matrice de transmettre des signaux modulant selon les cas l'adhésion, la migration, la prolifération, la différenciation ou encore la mort cellulaire (Baas et al., 2004; Basson, 2001; Basson et al., 1992b; Beaulieu, 1997).

Selon les molécules constitutives et l'organisation qui en découle, on distingue plusieurs types de matrice extracellulaire, dont les membranes basillaires qui sont les plus spécialisées. Ces dernières sont de fin treillis protéiques bi-dimensionnelles et continus sur lesquels reposent les différents feuillets cellulaires de l'organisme (Figure 5) (Lussier et al., 2000)

1.2.1 La membrane basilaire intestinale

L'épithélium intestinal repose directement sur une structure morphologique discrète où se concentrent les composés de la matrice extracellulaire et qui est appelée la membrane basilaire intestinale (BM). Cette structure est une entité biologiquement active, qui en plus de séparer physiquement l'épithélium intestinal du tissu conjonctif, elle fournit les substrats pour les cellules et assure un dialogue continu entre les deux compartiments tissulaires. Ces échanges interactifs entre les tissus sont essentiels à la bonne gestion des fonctions cellulaires intestinales notamment, la différenciation, le maintien et le remodelage du tissu (Seltana et al., 2010; Teller and Beaulieu, 2001).

La BM intestinale est une association de nombreuses glycoprotéines spécialisées, produites et déposées de manière hautement coordonnées au sein de la matrice extracellulaire. Ainsi, elle contient toutes les composantes majeures spécifiques à la plupart des lames basales, aussi bien que des macromolécules non exclusives retrouvées également dans la matrice extracellulaire interstitielle. La BM intestinale inclut dans sa composition les collagènes de type IV ($\alpha 1/\alpha 2$ et $\alpha 5/\alpha 6$), les laminines (laminine-111, laminine-211, laminine-332 et laminine-511/521), la fibronectine, la ténascine-C et l'ostéopontine, qui sont produits et déposés de manière complémentaire par les cellules épithéliales et les myofibroblastes directement sous-jacents (Figure 5) (Seltana et al., 2010; Seltana et al., 2012; Simon-Assmann et al., 1990)

La composition de la BM peut varier durant le développement de l'intestin grêle et le long de l'axe crypte/villosité. Ces variations compositionnelles sont associées à différentes régulations morphologiques et fonctionnelles essentielles dans l'intestin, qui dépendent de la nature et la force d'interaction des protéines de la BM aux récepteurs membranaires notamment les intégrines (Beaulieu et al., 1991; Teller et al., 2007).

Certaines pathologies graves directement associées à des mutations génétiques, ou à une altération dans l'expression et /ou la distribution des éléments de la BM, ont été décrites dans la littérature et témoignent de l'importance de cette dernière. À titre d'exemple, la dystrophie musculaire congénitale associée à une déficience en mérosine (MCMD) résulte d'une mutation de la chaîne $\alpha 2$ de la laminine-211 (Vachon et al., 1997). De même, dans la maladie de Crohn une décompartmentalisation des composantes de la BM a été rapportée, qui s'associe à une déstructuration de l'unité fonctionnelle intestinale soit l'axe crypte/villosité. En effet, les laminine-332 et -511 se délocalisent au fond de la crypte enflammée, qui démontre une perte d'expression de la laminine-211 et une baisse des niveaux de la ténascine-C (Bouatrouss et al., 2000; Francoeur et al., 2008; Francoeur et al., 2004; Seltana et al., 2012).

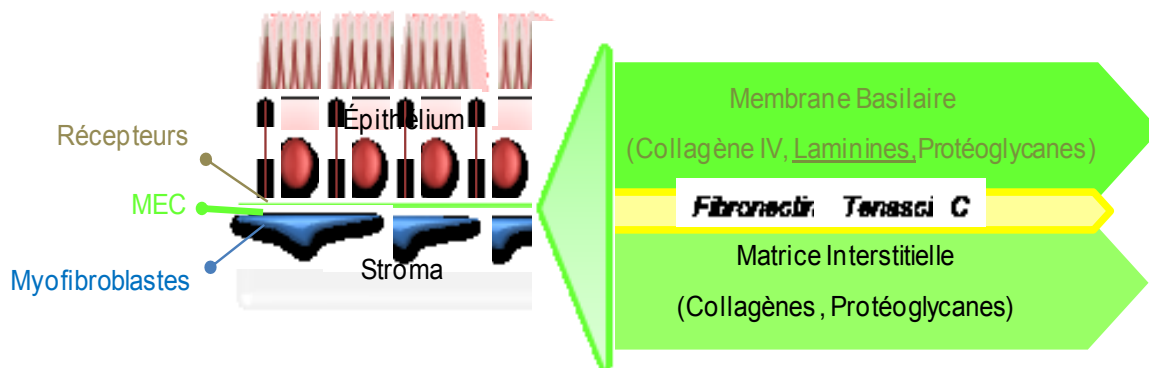


Figure 5 : La matrice extracellulaire.

Les cellules épithéliales intestinales demeurent ancrées au tissu intestinal et adhèrent aux composantes de la matrice extracellulaire au moyen des récepteurs membranaires. Au niveau de l'intestin, la matrice extracellulaire est composée d'une grande variété de protéines distribuées et organisées en deux structures fondamentales distinctes. D'une part, il y a la matrice interstitielle synthétisée par les cellules mésenchymateuses et qui contient les collagènes, les protéoglycanes, la fibronectine, etc... D'autre part, il y a la membrane basilaire qui est une structure morphologique discrète localisée entre l'épithélium et les myofibroblastes, et résultant de la synthèse commune et respective des deux couches cellulaires. La membrane basilaire est composée de macromolécules spécifiques telles que les laminines et le collagène IV ainsi que des composantes non exclusives comme la tenascin-C.

1.2.1.1 *Les laminines*

Les laminines sont des molécules hétérotrimérique composées de trois chaînes « α , β et γ » et elles représentent les composantes majeures de BM (Figure 6A). À ce jour, 11 molécules différentes de laminines ont été identifiées et qui résultent de l'association de 5 sortes de chaînes α , de 3 sortes de chaîne β et de 3 sortes de chaînes γ dans des combinaisons variées (Tableau. 1). Initialement identifiées comme étant des constituants structuraux de la BM, il est clair aujourd'hui que les laminines jouent aussi un rôle crucial dans diverses activités cellulaires, telles que l'adhésion, la croissance, la polarisation, la différenciation et même dans le développement et l'acquisition de la morphologie finale des tissus (Teller et al., 2007; Teller and Beaulieu, 2001; Timpl et al., 2000; Vachon and Beaulieu, 1995).

Quatre laminines distinctes ont été principalement identifiées dans la BM de la muqueuse intestinale : la laminine-111, la laminine-211, la laminine-511 et la laminine-332. À douze semaines de gestation, la laminine-111 est confinée au niveau des espaces intervillositaires alors que, les laminine-511 et -332 sont détectées au niveau de la membrane basilaire et elles longent la globalité de l'épithélium intestinal. À seize semaines de gestation la laminine-111 est graduellement remplacée par la laminine-211 au fond des cryptes intestinales naissantes. Par ailleurs, les laminine-511 et -332 sont observées strictement au niveau des villosités de l'apex jusqu'à la jonction crypte/villosité. Au stade adulte, les laminine-211 et -511 sont distribuées de manière complémentaire au niveau de l'axe crypte/villosité alors que la laminine-332 demeure restreinte à la villosité (Figure 6B) (Beaulieu and Vachon, 1994; Teller et al., 2007).

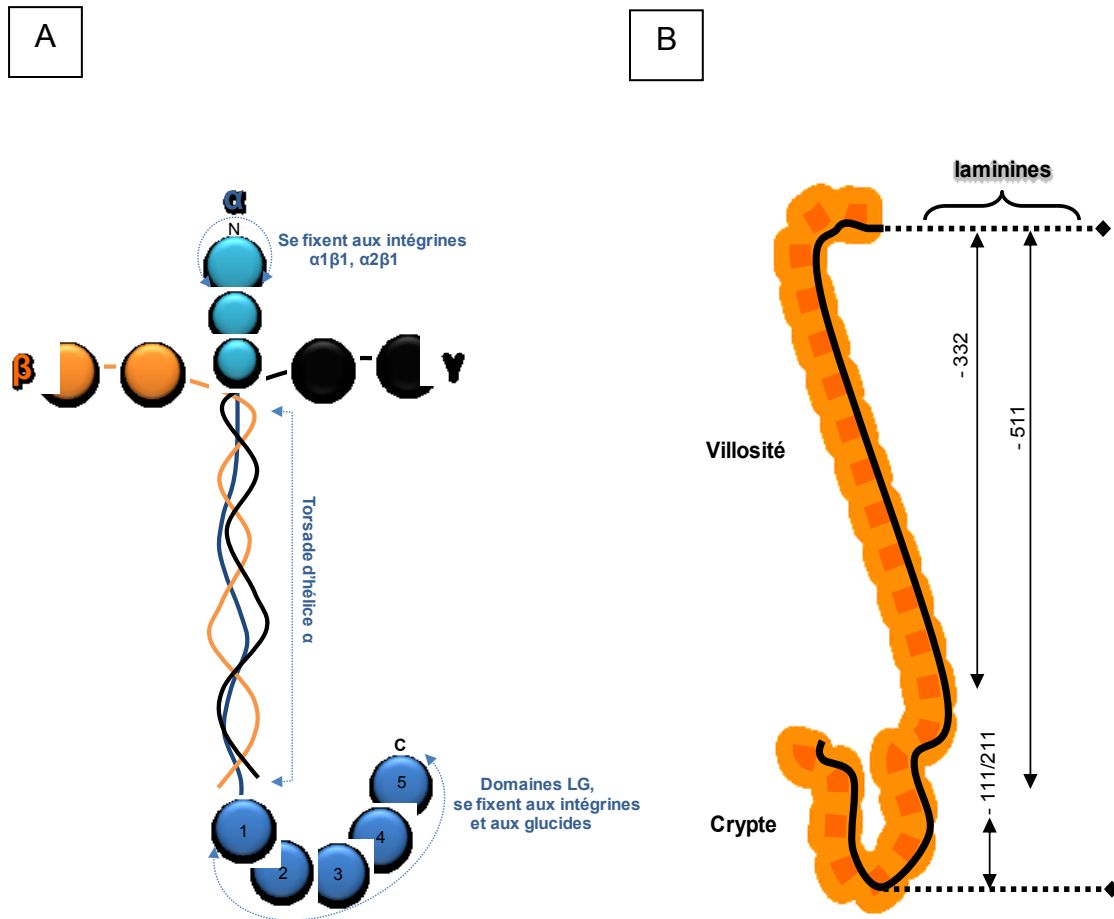


Figure 6: Les laminines et leurs distributions dans l'axe crypte/villosité.

Les laminines sont les composantes majeures de la membrane basilaire. Chaque molécule de laminine est composée de trois chaînes complémentaires « α , β et γ ». Différents sites déterminants pour la liaison aux récepteurs membranaires ainsi que différentes composantes de la membrane basilaire ont été identifiés au niveau de la structure hétérotrimérique des laminines, dont le domaine LG et l'extrémité N-terminale de la chaîne α (A). Dans l'intestin adulte, les laminines sont distribuées le long de la structure crypte/villosité. La laminine-211 remplace la laminine-111 au fond de la crypte durant le développement et y demeure à l'âge adulte exprimée de manière complémentaire avec la laminine-511. La laminine-332 est associée strictement à la villosité intestinale (B).

Tableau. 1 : La nomenclature des laminines.

Présentation des différents membres de la famille des laminines ainsi que leurs nomenclatures depuis leurs découvertes jusqu'à l'année 2005 (Aumailley et al., 2005).

| Trimère | 2005 | 1994 | < 1994 |
|----------------------------|-------------|-----------------|------------------------------------|
| $\alpha 1\beta 1\gamma 1$ | 111 | laminin-1 | EHS laminin |
| $\alpha 1\beta 2\gamma 1$ | 121 | laminin-3 | s-laminin |
| $\alpha 2\beta 1\gamma 1$ | 211 | laminin-2 | merosin |
| $\alpha 2\beta 2\gamma 1$ | 221 | laminin-4 | s-merosin |
| $\alpha 2\beta 1\gamma 3$ | 213 | laminin-12 | |
| $\alpha 3A\beta 3\gamma 2$ | 332 or 3A32 | laminin-5 or 5A | kalinin, nicein, epiligrin, radsin |
| $\alpha 3B\beta 3\gamma 2$ | 3B32 | laminin-5B | |
| $\alpha 3A\beta 1\gamma 1$ | 311 or 3A11 | laminin-6 or 6A | k-laminin |
| $\alpha 3A\beta 2\gamma 1$ | 321 or 3A21 | laminin-7 or 7A | ks-laminin |
| $\alpha 4\beta 1\gamma 1$ | 411 | laminin-8 | |
| $\alpha 4\beta 2\gamma 1$ | 421 | laminin-9 | |
| $\alpha 4\beta 2\gamma 3$ | 423 | laminin-13 | |
| $\alpha 5\beta 1\gamma 1$ | 511 | laminin-10 | |
| $\alpha 5\beta 2\gamma 1$ | 521 | laminin-11 | |
| $\alpha 5\beta 2\gamma 2$ | 522 | laminin-14 | |
| $\alpha 5\beta 2\gamma 3$ | 523 | laminin-15 | |

1.3 Les intégrines

Découvertes, il ya plus de vingt ans, les intégrines sont une grande famille de récepteurs hétérodimériques transmembranaires de type I. Elles sont exprimées dans beaucoup d'organismes vivants allant des éponges et des coraux jusqu'aux mammifères (Burke, 1999). Les intégrines se présentent dans une structure combinant deux sous-unités α et β de manière non-covalente. À ce jour, 18 sous-unités α et 8 sous-unités β ont été identifiées et dont résultent 24 hétérodimères d'intégrines différents fonctionnant comme les récepteurs principaux dans les processus d'adhérence cellulaire et qui possèdent la particularité de connecter les environnements intra- et extracellulaires (Figure 7) (Beaulieu, 1997; Hynes, 2002; Zent, 2010).

Chaque hétérodimère d'intégrine est constitué d'un large domaine extracellulaire qui assure la liaison avec les protéines de l'environnement extracellulaire, d'un domaine transmembranaire et généralement d'une petite queue cytoplasmique (exception $\alpha 6\beta 4$) associée au cytosquelette d'actine par l'intermédiaire de protéines adaptatrices cytoplasmiques (Figure 7) (Hynes, 2002).

Les intégrines peuvent lier différentes glycoprotéines de la matrice extracellulaire incluant les collagènes, la fibronectine, les laminines mais aussi des récepteurs cellulaires et des molécules d'adhésion intercellulaires (Hynes, 2002; Plow et al., 2000). De plus, elles participent activement à la mise en place et à l'assemblage du cytosquelette d'actine. Les intégrines modulent aussi diverses voies de signalisation intracellulaire impliquées dans le contrôle de fonctions biologiques et cellulaires, telles que l'adhésion, la migration, la prolifération, la différenciation cellulaire et la mort cellulaire (Basora et al., 1998; Basora et al., 1997; Beaulieu, 2010; Benoit et al., 2012a; Benoit et al., 2009; Schwartz et al., 1995; Zent, 2010).

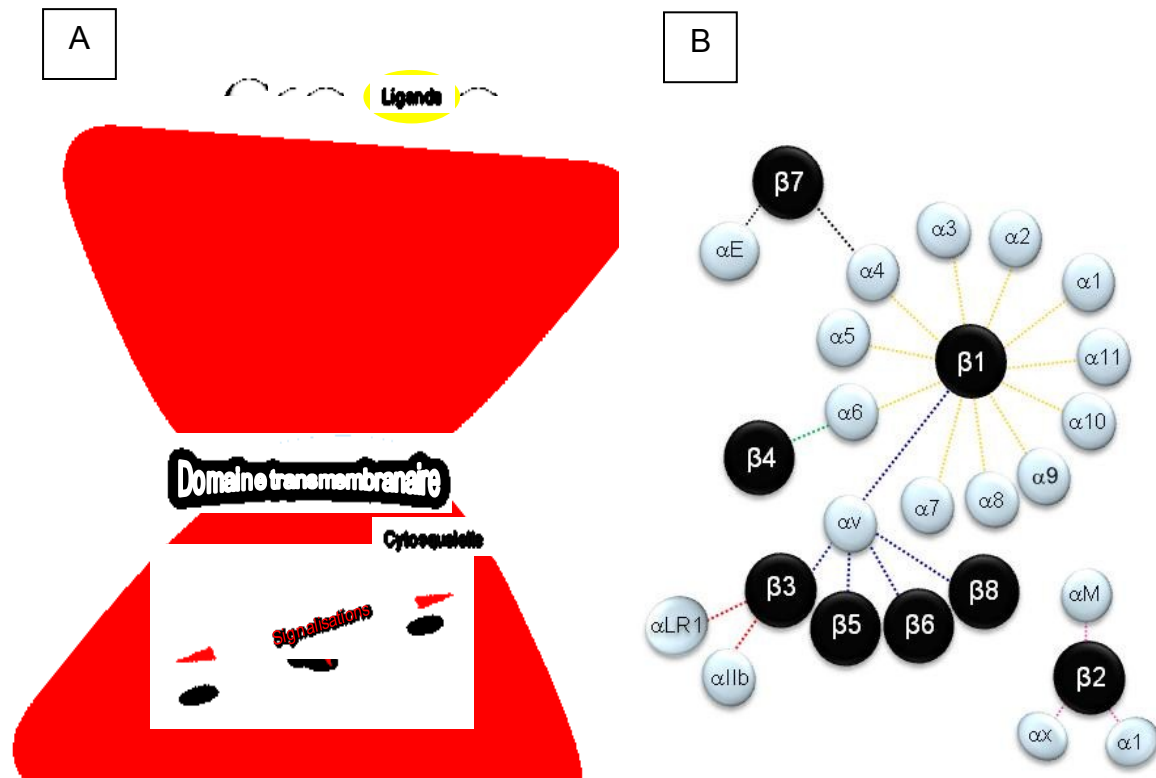


Figure 7 : Les intégrines.

Les molécules d'intégrines résultent de l'association de deux sous-unités α et β et ce, de manière non-covalente (A). Présentation des 18 sous-unités α , des 8 sous-unités β et des 24 combinaisons connues (B).

1.3.2 Données structurales des intégrines

L'importance gagnée par les intégrines au courant des années dans l'établissement de l'adhésion et de la modulation de la signalisation cellulaire (Section 1.3.3) a mis l'accent sur l'importance de leurs structures et leurs conformations.

1.3.2.1 Domaine extracellulaire

Les intégrines sont généralement dotées d'un large domaine extracellulaire constitué d'une succession de sous-domaines. Les portions

extracellulaires des sous-unités α et β sont organisées en un domaine N-terminal globulaire de liaison au ligand qui repose sur deux longues jambes C-terminales qui les relient à leurs domaines transmembranaires et cytoplasmiques respectives. Le domaine extracellulaire d'une intégrine peut adopter deux conformations différentes, soit repliée/et à faible affinité ou dépliée/et à haute affinité. Le redressement de ce dernier dévoile des sites essentiels d'interactions avec la matrice extracellulaire (Figure 8A) (Hynes, 2002; Luo et al., 2007; Xiong et al., 2003).

Les sous-unités α sont constituées d'un domaine propulseur β (*propeller*) associant sept séquences organisées comme les pales d'une hélice qui repose sur un corps structuré par une cuisse (*thigh*), un genou (*genu*) (ou coude) et deux mollets (*calf 1 et 2*). Certaines sous-unités α sont enrichies d'un domaine α d'interaction additionnel inséré au cœur du domaine propulseur. Ce domaine α d'interaction représente le domaine extracellulaire exclusif de liaison avec la matrice (Figure 8B) (Xiong et al., 2001).

Les sous-unités β sont toutes équipées d'un domaine β d'interaction à la matrice (structure similaire au domaine α), d'un domaine d'hybridation, de quatre domaines EGF et d'un domaine de queue (β -*tail*). Les sous-unités β jouent un rôle crucial dans la liaison des ligands aux sous-unités α ne possédant pas de domaine α d'interaction avec la matrice (Figure 8B) (Xiong et al., 2001).

Chaque intégrine est capable de reconnaître et de lier des composantes bien définies au niveau de la matrice extracellulaire. Les intégrines $\alpha 1\beta 1$ $\alpha 2\beta 1$ $\alpha 10\beta 1$ $\alpha 11\beta 1$ représentent les récepteurs aux collagènes, les intégrines $\alpha 3\beta 1$ $\alpha 6\beta 1$ $\alpha 6\beta 4$ $\alpha 7\beta 1$ sont les récepteurs majeurs aux laminines et les intégrines $\alpha 5\beta 1$ $\alpha 8\beta 1$ $\alpha 11\beta 3$ $\alpha v\beta 3$ lient majoritairement la fibronectine et autres composantes de la MEC au niveau d'un motif RGD (Arg-Gly-Asp). Néanmoins, plusieurs intégrines peuvent reconnaître le même ligand extracellulaire et inversement, plusieurs ligands peuvent être reconnus par une même intégrine mais cependant, avec des affinités de liaisons fortes différentes (Hynes, 2002; Nishiuchi et al., 2006; Ruggiero et al., 1996; Takada et al., 2007; Teller and Beaulieu, 2001; van der Flier and Sonnenberg, 2001; Zent, 2010).

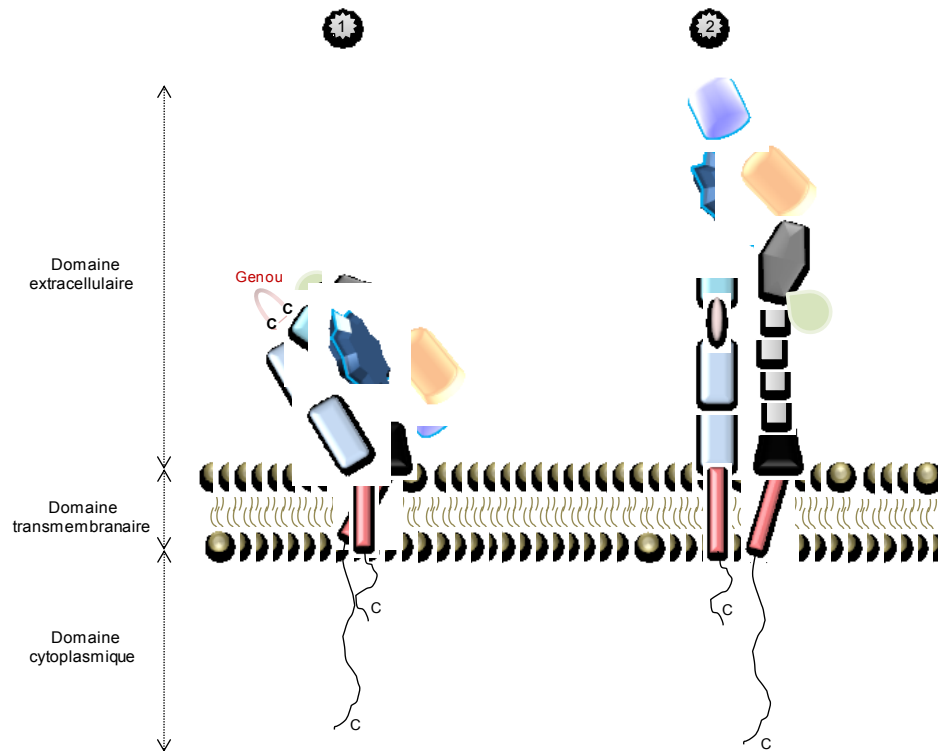
1.3.2.2 *Domaine transmembranaire*

Le domaine transmembranaire d'une intégrine traverse une seule fois la membrane plasmique et sa structure comprend 25 à 29 aa organisée sous forme d'une hélice α . Les domaines transmembranaires des sous-unités α et β d'une intégrine repliée sont hautement compactés. La séparation de ces derniers est requise pour l'acquisition d'une conformation à haute affinité par une intégrine (Figure 8) (Gottschalk, 2005; Zent, 2010).

1.3.2.3 *Domaine cytoplasmique*

Le domaine cytoplasmique des intégrines est généralement court, peu structuré et composé de 10 à 70 aa (Figure 8B). Au niveau intracellulaire et sans être directement liées à l'actine, les intégrines recrutent de multiples protéines régulant la motilité et le réarrangement du cytosquelette, qui servent à leurs tours de plateforme pour les interactions avec des protéines de la signalisation cellulaire. Certaines des protéines du cytosquelette ont été particulièrement associées à un rôle clé dans l'activation et le changement conformationnel des intégrines. C'est le cas de la taline et de la kindline qui s'associent à la sous-unité β respectivement au niveau des deux motifs conservés NpxY en position proximale et NxxY en position distale par rapport à la membrane cellulaire. Ces dernières, sont essentielles pour la séparation des queues cytoplasmiques des sous-unités α et β d'une intégrine et pour son activation subséquente (Calderwood et al., 2003; Zent, 2010).

A



B

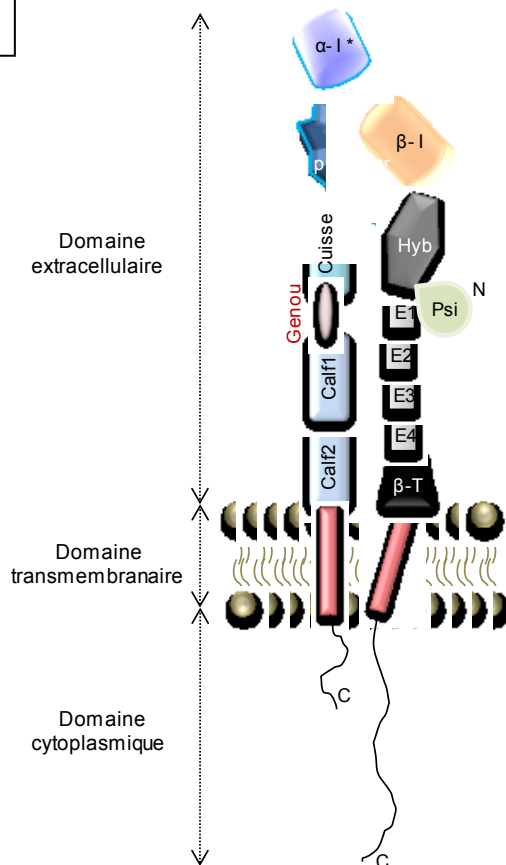


Figure 8 : Conformations et structures des intégrines. (A) Le domaine extracellulaire d'une intégrine peut adopter deux conformations distinctes, soit repliée/et à faible affinité (1) ou dépliée/et à haute affinité (2). (B) Illustration de la structure d'une intégrine. Chaque hétérodimère d'intégrine est constitué d'un large domaine extracellulaire, d'un domaine transmembranaire et d'une petite queue cytoplasmique. α -I* (domaine α I d'interaction), β -I (domaine β I d'interaction), Hyb (domaine d'hybridation), E 1-4 (domaines EGF), β -T (β -Tail ou domaine de queue). Adapté de Campbell et Humphries (2011).

1.3.3 Données fonctionnelles des intégrines

En tant que molécules d'adhésions, les intégrines assurent une connexion entre la matrice extracellulaire et la cellule. Cette connexion implique les intégrines dans une signalisation bidirectionnelle à travers la membrane plasmique. Les intégrines peuvent transduire un signal vers l'intérieur de la cellule suite à la liaison avec un ligand extracellulaire selon une signalisation classique de l'extérieur vers l'intérieur de la cellule (*outside – in*). Toutefois, contrairement à la plupart des autres récepteurs cellulaires, l'intégrine peut basculer entre une conformation de faible et de haute affinité de liaison à un ligand selon une signalisation de l'intérieur vers l'extérieur de la cellule (*inside – out*). En effet, des signaux d'activation propagés de l'intérieur de la cellule induisent un redressement des domaines extracellulaires et stabilisent la conformation active d'une intégrine. Ce changement de conformation expose des sites de liaison extérieurs au niveau desquelles se lie le ligand et dont résulte un signal vers l'intérieur de la cellule (Hynes, 2002; Takada et al., 2007; Xiong et al., 2003; Zent, 2010).

La liaison d'un ligand extracellulaire conduit à un regroupement (*clustering*) des intégrines au niveau de la membrane plasmique, ce qui donne naissance aux complexes d'adhésion focaux (FA). Ces complexes sont de larges complexes de protéines intracellulaires qui servent de centre de transmission des signaux intracellulaires. Les FA sont essentiels pour l'assemblage des filaments d'actine et pour le contrôle global de la dynamique et de l'organisation du cytosquelette. D'un autre côté, les FA forment des points d'attachement entre la cellule et sa matrice extracellulaire, ce qui rajoute à l'affinité de liaison intégrine – ligand une plus grande avidité et permet de transmettre des consignes spécifiques de survie, de prolifération ou encore de différenciation cellulaire (Geiger et al., 2009; Zaidel-Bar et al., 2007; Zent, 2010).

Les voies de signalisation activées en aval des intégrines sont extrêmement compliquées et diffèrent en fonction des types cellulaires et des conditions physiologiques. Néanmoins certaines molécules clés sont reconnues

comme étant importantes dans la formation des complexes de signalisation qui initient la transduction de la signalisation dépendante des intégrines (Geiger et al., 2009; Giancotti and Ruoslahti, 1999; Giannoni et al., 2010; Zent, 2010).

Le complexe de signalisation Src – FAK est l'un des complexes clés connus pour initier la signalisation dépendante des intégrines (Canel et al., 2010; Zent, 2010). Src est une tyrosine kinase qui appartient à la famille des Src kinase qui inclue entre autre Fyn et Yes et qui est activée suite au regroupement (*clustering*) des intégrines. FAK est aussi une tyrosine kinase qui se lie indirectement aux sous-unités β des intégrines (Giannoni et al., 2010; Seltana et al., 2013). Suite à l'activation d'une intégrine, FAK subit un changement de conformation entraînant son auto-phosphorylation sur le résidu tyrosine 397 (Y397). FAK activée interagit avec Src qui sera pleinement activée à son tour et vont pouvoir transmettre un signal intracellulaire bien spécifique qui va soutenir différentes fonctions cellulaires. Les voies de signalisation majeures en aval du complexe Src –FAK sont la voie MEK/ERK et la voie PI3K/Akt, qui au niveau des cellules épithéliales intestinales sont connues pour soutenir la survie cellulaire (Lemieux et al., 2011; Vachon, 2011; Vachon et al., 2002)

1.3.4 Expression des intégrines à laminines au sein de l'unité fonctionnelle intestinale

Tout comme les laminines, les intégrines spécifiques pour les laminines présentent une distribution différentielle au cours du développement mais aussi au niveau de l'axe crypte/villosité de l'intestin grêle adulte. Quatre intégrines $\alpha 2\beta 1$, $\alpha 3\beta 1$, $\alpha 7\beta 1$ et $\alpha 6\beta 4$ qui possèdent une affinité de liaison pour les laminines ont été identifiées dans les cellules épithéliales intestinales. Les intégrines $\alpha 2\beta 1$ et $\alpha 3\beta 1$ sont exprimées au niveau du domaine basal des cellules intestinales selon un patron de distribution complémentaire. L'intégrine $\alpha 2\beta 1$ est restreinte à la crypte intestinale alors que l'intégrine $\alpha 3\beta 1$ est associée à la villosité. L'expression de l'intégrine $\alpha 7\beta 1$ coïncide avec l'acquisition des caractéristiques de différenciation pendant le développement de l'intestin humain et est localisée à la jonction crypte/villosité chez l'adulte. Pour ce qui est de

l'intégrine $\alpha 6 \beta 4$, elle est exprimée à la base des cellules épithéliales intestinales et le long de l'axe crypte/villosité (Figure 9) (Beaulieu, 1997; Benoit et al., ; Lussier et al., 2000; Perreault et al., 1995).

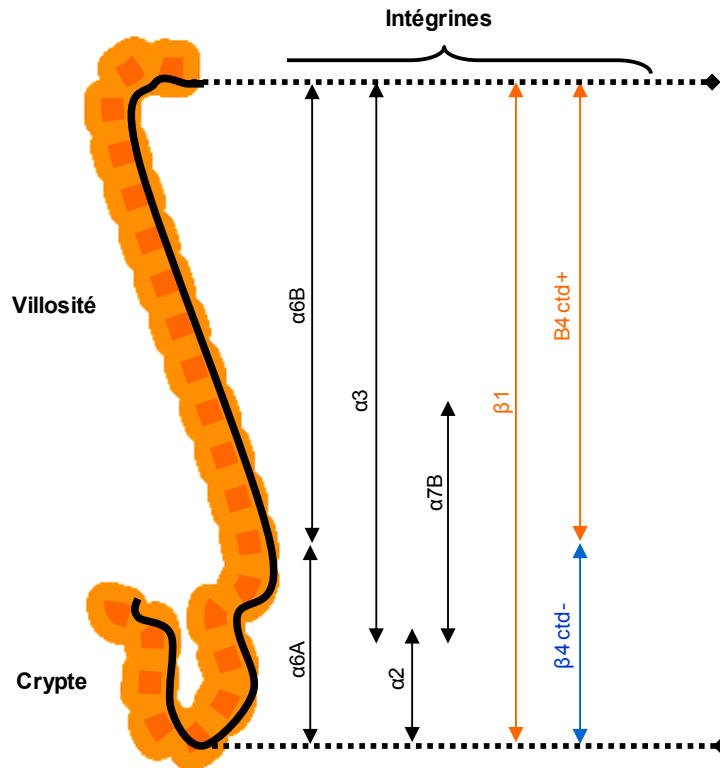


Figure 9 : Distribution des intégrines au niveau de l'axe crypte/villosité.

Dans l'intestin adulte, les intégrines sont distribuées le long de la structure crypte/villosité. L'intégrine $\alpha 2 \beta 1$ est exprimée au niveau de la crypte et ce, de manière complémentaire à l'intégrine $\alpha 3 \beta 1$ qui est associée strictement à la villosité intestinale. L'intégrine $\alpha 7 \beta 1$ est principalement exprimée au niveau de la jonction crypte/villosité soit, le tiers supérieur de la crypte et le tiers inférieur de la villosité. L'intégrine $\alpha 6 \beta 4$ est exprimée à la base des cellules épithéliales intestinales et le long de l'axe crypte-villosité. Deux formes de l'intégrine $\alpha 6 \beta 4$ ont été décrites, l'intégrine $\alpha 6 \beta 4 \text{ctd}^-$ et l'intégrine $\alpha 6 \beta 4 \text{ctd}^+$ qui sont respectivement exprimées par les cellules prolifératives et les cellules quiescentes/différenciées.

1.4 L'intégrine $\alpha 7 \beta 1$

Découverte en 1985 dans les myoblastes du muscle squelettique, ce n'est qu'en 1992 qu'elle fut décrite, telle qu'une nouvelle sous-unité α d'intégrine et qu'on lui donna le nom de $\alpha 7$. La sous-unité $\alpha 7$ est synthétisée sous forme d'un polypeptide de 1135 acide aminé qui sera clivé dans la cellule pour former une chaîne lourde (~100 kDa) et une chaîne légère (~30 kDa) connectées par un pont disulfure. Elle se complexe avec la sous-unité $\beta 1$ pour former l'intégrine $\alpha 7 \beta 1$ qui est exprimée dans les cellules de muscle lisse, squelettique, cardiaque et vasculaire (Figure 10) (Echtermeyer et al., 1996; Kaufman et al., 1985; Kramer et al., 1991; Song et al., 1992; Song et al., 1993; Vachon et al., 1997; Ziober et al., 1993).

Durant le développement du muscle squelettique l'intégrine $\alpha 7 \beta 1$ participe à la régulation de plusieurs fonctions cellulaires, telles que l'adhésion, la migration, la prolifération et la différenciation des myoblastes. Après la maturation des myofibres, l'intégrine $\alpha 7 \beta 1$ adopte des localisations bien particulières, soit le long du sarcolemme et concentrées dans les costamères, les jonctions myotendineuses (MTJs) et les jonctions neuromusculaires (NMJs). Au niveau de ces sites, l'intégrine $\alpha 7 \beta 1$ joue un rôle essentiel dans le maintien d'une connexion entre les myofibres et la matrice extracellulaire. Cette connexion est requise pour recevoir et transmettre des signaux aux cellules mais aussi pour résister aux forces de contraction musculaire (Burkin and Kaufman, 1999; Collo et al., 1993). D'autre part, l'intégrine $\alpha 7 \beta 1$ peut agir et propager des signaux, tels qu'un mécanorécepteur qui protège le muscle contre les dommages causés à la suite d'un exercice physique (Boppart et al., 2006).

L'importance du rôle de l'intégrine $\alpha 7 \beta 1$ dans le maintien de l'intégrité du muscle squelettique est observée au niveau clinique. La mutation du gène codant pour la sous-unité $\alpha 7$ (*ITGA7*) se manifeste par une myopathie congénitale sévère. En effet, chez l'humain un retard de développement associé à des troubles de mobilité a été observé. Chez la souris, les travaux rapportent une dystrophie musculaire qui affecte les jonctions myotendineuses associées à

des défauts de formation des muscles vasculaires lisses et de la déposition de la matrice extracellulaire. De même, des niveaux plus élevés de $\alpha 7\beta 1$ ont été observés chez les patients ayant la maladie de Duchenne ainsi que chez les souris *mdx* (Guo et al., 2006; Marshall et al., 2012; Mayer et al., 1997; Welser et al., 2007; Welser et al., 2009; Werner et al., 2000). Cette augmentation est présentée comme étant une compensation pour l'absence du complexe dystrophine –glycoprotéine. Ce qui va de pair avec une modulation de la sévérité de la myopathie à la suite d'une surexpression ou une inhibition de l'expression de la sous-unité $\alpha 7$ dans des souris *mdx/\alpha 7*^{-/-} (déficiente pour le complexe dystrophine –glycoprotéine et l'expression de sous-unité $\alpha 7$) (Doe et al., ; Lapointe et al., 2009; Liu et al.)

L'intégrine $\alpha 7\beta 1$ est un récepteur à laminines. Elle peut lier de multiple isoformes de laminines incluant la laminine-111, -211 et -511 et, en conséquence, réguler plusieurs fonctions cellulaires (Tableau. 2) (Nishiuchi et al., 2006; Taniguchi et al., 2009). La sous-unité $\alpha 7$ est assujettie à diverses régulations qui définissent et modulent ses affinités de liaison aux ligands (de Rezende et al., 2012; Nishiuchi et al., 2006; Taniguchi et al., 2009). Le transcrit de la sous-unité $\alpha 7$ subit une régulation par épissage alternatif de l'ARN dont résultent deux domaines cytoplasmiques désignés par $\alpha 7A$ et $\alpha 7B$ ainsi que deux domaines extracellulaires désignés par $\alpha 7X1$, $\alpha 7X2$. Les domaines cytoplasmiques diffèrent dans leurs tailles, leurs séquences, leurs potentielles à transduire un signal, leurs associations et leurs distributions. L'expression du domaine $\alpha 7A$ est restreinte au muscle squelettique où il est concentré dans les jonctions myotendineuses et neuromusculaires des fibres musculaires. Par contre, le domaine cytoplasmique $\alpha 7B$ est exprimé dans les myoblastes et les myofibres et il est aussi détecté dans les cellules du cœur, du muscle lisse et les neurones. Pareillement, les domaines extracellulaires de la sous-unité $\alpha 7$ diffèrent dans leurs distributions, leurs spécificités et leurs affinités de liaison aux laminines (Liu et al., 2008; Song et al., 1993). Dans la littérature, des modifications post-traductionnelles de la sous-unité $\alpha 7$ ont été aussi présentées, incluant la glycosylation, l'ADP-ribosylation ainsi que le clivage protéolytique.

Ces modifications influencent grandement les affinités de liaison et les fonctions de l'intégrine $\alpha 7 \beta 1$ (Liu et al., 2008; Zolkiewska and Moss, 1995).

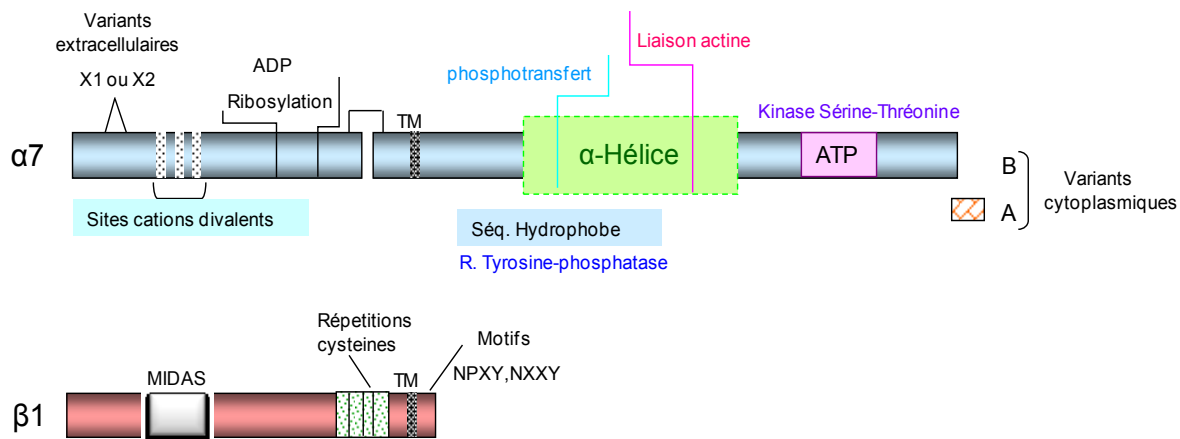


Figure 10: Structure et domaines fonctionnels de l'intégrine $\alpha 7 \beta 1$.

La sous-unité $\alpha 7$ est synthétisée sous forme d'un polypeptide de 1135 acide aminé. La sous-unité $\alpha 7$ inclue dans sa structure différents sites potentiellement fonctionnels pour la modulation de la signalisation intracellulaire ainsi que la réorganisation du cytosquelette. Quatre variants de la sous-unité $\alpha 7$ ont été identifiés, résultant de différents épissages alternatifs, deux variants cytoplasmiques $\alpha 7A$ et $\alpha 7B$ et deux variants extracellulaires $\alpha 7X1$ et $\alpha 7X2$. La sous-unité $\alpha 7$ se complexe avec la sous-unité $\beta 1$ pour former l'intégrine $\alpha 7 \beta 1$.

Tableau. 2: Constantes de dissociation de l'intégrine $\alpha 7 \beta 1$ pour les laminines.

| laminine | 2005 <i>R. Nishiuchi et al,</i> | | | | | 2007 <i>H. Von der Mark et al,</i> | | 2009 <i>Y. Tniguchi et al,</i> | |
|---------------------|------------------------------------|-----------------|------|------|---------------|---------------------------------------|----------------------|-----------------------------------|-----------------|
| | -111 | -211/221 | -332 | -411 | -511/521 | -111 | -411 | -511 | -521 |
| $\alpha 7X1\beta 1$ | ND | $0,64 \pm 0,35$ | ND | ND | $1,2 \pm 0,5$ | $2,4 \times 10^{-8}$ | $1,4 \times 10^{-9}$ | $1,05 \pm 0,23$ | $0,81 \pm 0,13$ |
| $\alpha 7X2\beta 1$ | $0,97 \pm 0,26$ | $2,6 \pm 0,7$ | ND | ND | ND | $4,6 \times 10^{-9}$ | 5×10^{-8} | ND | $11,6 \pm 1,97$ |

ND : résultat non déterminé à cause d'une saturation partielle en présence d'une très grande concentration d'intégrine.

1.5 La différenciation entérocytaire

Tel que mentionné précédemment, quatre types cellulaires distincts assurent les fonctions de sécrétion, de défense de l'organisme (les cellules à mucus, les cellules entéroendocrines et les cellules de Paneth), de transport et d'absorption (les cellules absorbantes) au niveau de l'épithélium intestinal la spécialisation et l'acquisition de la maturité terminale de ces cellules sont l'œuvre d'un processus finement régulé de différenciation cellulaire (Barker et al., 2008a).

Ainsi, à partir de la division asymétrique d'un précurseur unique soit une cellule souche de la crypte intestinale deux cellules filles émergeront et dont une seule sera destinée à se différencier. Cette dernière perdra son aptitude à proliférer et elle sera dirigée vers l'une des voies de la différenciation de l'épithélium intestinal, soit la voie sécrétrice ou la voie absorbante. La détermination vers l'une de ces voies dépend de l'activation de la cascade de signalisation Notch ainsi que la balance entre l'expression de facteurs de transcription HES-1 et HATH-1. En effet, une activation de Notch associée à une expression prédominante de HES-1 sur HATH-1 destine la cellule vers la voie absorbante. À l'opposé, une inactivation de Notch favorise une expression de HATH-1 plus élevée que celle de HES-1 et une détermination vers la voie sécrétrice (Pageot et al., 2000; Sancho et al., 2003).

Environ 90% des cellules de l'épithélium intestinal vont acquérir un phénotype de cellule absorbante. Des études récentes associent la différenciation en cellule absorbante à l'action de différents facteurs de transcription. Plus spécifiquement, le facteur de transcription CDX-2 appartenant à la catégorie de gènes de type homéobox a été pressenti pour un rôle central dans le déclenchement du processus de la différenciation entérocytaire. De plus, il a été démontré que des interactions physiques entre CDX-2 et d'autres facteurs de transcriptions, notamment HNF-1 α et GATA-4, sont pré-requises à l'expression de gènes associés à la différenciation entérocytaire. Parmi ces gènes sont cités la sucrase-isomaltase, la lactase phlorizine hydrolase et la dipeptidyl peptidase IV. Dans ce sens, l'action concertée des facteurs de

transcriptions CDX-2, HNF-1 α et GATA-4 peut participer à l'enclenchement du processus de différenciation entérocytaire chez l'humain (Benoit et al., 2010; Bosse et al., 2007; Boudreau et al., 2002) .

1.6 Les cellules Caco-2

La lignée cellulaire de carcinome de colon humain Caco-2 a été fort bien caractérisée et utilisée dans l'investigation de diverses fonctions des cellules épithéliales intestinales ainsi que dans la compréhension de la régulation de la barrière intestinale (Seltana et al., 2011).

À ce jour, les cellules Caco-2 demeurent le seul modèle cellulaire capable de reproduire spontanément en culture plusieurs caractéristiques clés spécifiques aux cellules épithéliales de l'intestin humain, particulièrement en terme de polarisation et d'expression de marqueurs de différenciation cellulaire (Menard and Beaulieu, 1994). L'analyse cellulaire a permis de révéler des propriétés remarquables de ces dernières. En effet, durant les premiers 20 jours de confluence cellulaire, les cellules Caco-2 forment une monocouche au sein de laquelle elles exhibent une hétérogénéité transitoire dans leurs acquisitions des caractéristiques de la différenciation cellulaire. Cette particularité communément décrite par patron en mosaïque est maintenue dans les clones et les sous clones de la lignée cellulaire Caco-2 (Beaulieu and Quaroni, 1991; Vachon and Beaulieu, 1992; Vachon et al., 1996b).

Utilisé entre les passages 15 et 40 après clonage, le clone stable Caco-2/15 entame spontanément en culture standard et à la confluence un processus d'arrêt de la prolifération cellulaire et exécute graduellement le programme complet de la différenciation fonctionnelle entérocytaire. Étant initialement établi à partir d'adénocarcinome de colon, les cellules Caco-2/15 possèdent des propriétés biochimiques et morphologiques apparentées à l'intestin grêle fœtale humain. En effet, à la confluence ces dernières acquièrent la polarité morphologique avec formation de complexes de jonctions matures et la génération d'une bordure en brosse typique qui exprime des marqueurs biochimiques spécifiques associés aux entérocytes. Cette caractéristique

particulière des cellules Caco-2/15 en a fait un outil d'exception pour la compréhension des mécanismes régulant l'expression des gènes et des protéines associés au processus de la différenciation des cellules épithéliales intestinales. Cela est fort bien illustré dans les études de l'expression des hydrolases de la bordure en brosse notamment celles de la sucrase-isomaltase (Escaffit et al., 2005a; Escaffit et al., 2005b; Vachon and Beaulieu, 1992; Vachon et al., 1996b). De même, ces dernières ont été avantageusement utilisées pour fournir des preuves quant aux sites de contrôle transcriptionnel et post-transcriptionnel, la dépendance aux activités MAPKinase, l'influence des facteurs de croissance et les interactions cellule-matrice. La pertinence des cellules Caco-2/15 a été aussi exploitée pour comprendre la régulation globale de la survie cellulaire et de l'apoptose/anoïkis dans les cellules épithéliales intestinales humaines (Figure 11) (Aliaga et al., 1999; Basson et al., 1992a; Basson et al., 1992b; Beaulieu et al., 1989; Beaulieu and Quaroni, 1991; Dufour et al., 2004; Quaroni et al., 1993; Seltana et al., 2010; Seltana et al., 2011; Vachon and Beaulieu, 1995; Vachon et al., 2002).

La démonstration que les cellules Caco-2/15 pleinement différenciées sont fidèles aux cellules villositaires de l'intestin grêle humain a été amplement fournie en terme de caractérisation biochimique et ultrastructurale, de molécules d'adhésions cellulaires, de signalisation, de cycle cellulaire et de métabolisme de lipide (Beaulieu et al., 1989; Beaulieu and Quaroni, 1991; Escaffit et al., 2005a; Escaffit et al., 2005b; Gagne et al., ; Levy et al., 2009; Sane et al., 2006). Cependant, leur nature cancéreuse ainsi que leur origine colonique ont provoqué des réserves quant à leur pertinence physiologique. Néanmoins, une analyse récente de micropuce à ADNc montre qu'autant les cellules prolifératives Caco-2/15 sont différentes des cellules épithéliales intestinales prolifératives, les cellules Caco-2/15 différenciées partagent de fortes et significatives similitudes dans leur profil génique avec les cellules épithéliales différenciées de l'intestin humain (Tremblay et al., 2006). Ce qui en fait le modèle de choix pour l'étude du mécanisme de la différenciation entérocytaire terminale.

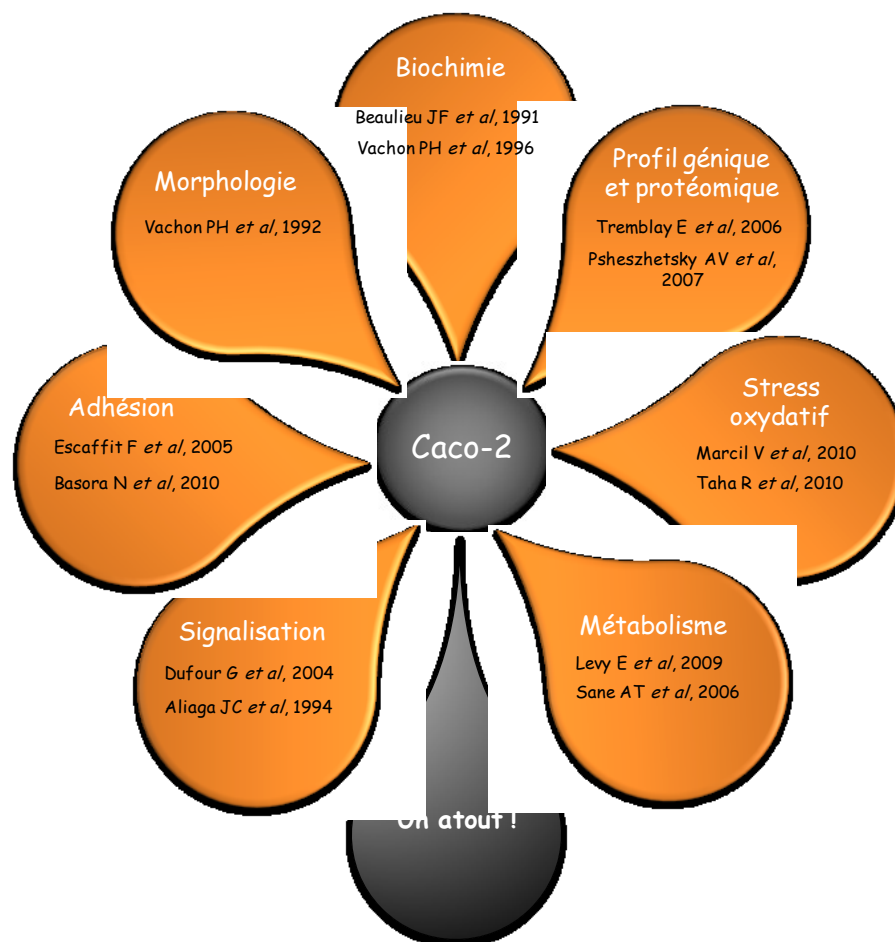


Figure 11 : Les atouts des cellules Caco-2

La lignée cellulaire de carcinome de colon humain Caco-2 a été très bien caractérisée et utilisée dans l'investigation de diverses fonctions des cellules épithéliales intestinales ainsi que dans la compréhension de la régulation de la barrière intestinale.

1.7 Objectifs de la thèse

Mon projet de recherche vise à déterminer le rôle de l'intégrine $\alpha 7\text{B}\beta 1$ au sein de l'unité fonctionnelle de l'intestin humain.

Dans une précédente étude de Basora et al, les auteurs ont montré l'expression de l'intégrine $\alpha 7\text{B}\beta 1$ dans l'épithélium de l'intestin grêle humain. L'analyse en microscopie par immunofluorescence indirecte a permis d'observer que la sous-unité $\alpha 7\text{B}$ est associée spécifiquement à la jonction crypte/ villosité de l'intestin adulte, soit une zone effective et critique pour l'acquisition de la différenciation entérocytaire terminale. L'analyse de l'expression de la sous-unité $\alpha 7\text{B}$ dans les cellules Caco-2/15 montre un pic d'expression transitoire à 3 jours post confluence, un stade qui correspond avec le début d'expression de la sucrase-isomaltase, un marqueur spécifique de la différenciation des cellules épithéliales intestinales, suggérant un lien entre l'intégrine $\alpha 7\text{B}\beta 1$ et la différenciation intestinale (Basora et al., 1997).

Dans le but de tester cette hypothèse, nous avons choisi :

1. D'étudier l'impact d'une inhibition de l'expression de la sous-unité $\alpha 7\text{B}$, par des essais d'infection lentivirales par shARN, sur les cellules Caco-2/15. L'étude se base sur une caractérisation biochimique et morphologique des cellules Caco-2/15 sh $\alpha 7\text{B}$ ainsi qu'une analyse de leur croissance cellulaire.
2. D'analyser la réponse des cellules épithéliales intestinales à une expression forcée de la sous-unité $\alpha 7\text{B}$.
3. D'identifier les mécanismes de régulations moléculaires induites par l'intégrine $\alpha 7\text{B}\beta 1$ au sein des cellules épithéliales intestinales.

Matériel et méthodes

2.1 Culture cellulaire

Des clones stables de cellules de carcinome de colon humain Caco-2 (HBT37; ATCC, Rockville, MD, USA), soit les Caco-2/15, ont été utilisés dans ce travail. Les caractéristiques de cette lignée cellulaire ont été détaillées dans la section « introduction ». Ces cellules se distinguent par un programme complet de différenciation biochimique et morphologique, comparable à celui observé au niveau de l'épithélium intestinal fœtal. Seulement les passages de 54-73 ont été utilisés et les cellules ont été maintenues en culture tel que décrit précédemment.

2.2 Génération des lignées shRNA

Cinq séquences shRNA spécifiques à la sous-unité intégrine $\alpha 7B$ (Figure 12), élaborées et achetées par Sigma-Aldrich (St-louis, MO), ont été testées dans des cellules Caco-2/15, moyennant des infections lentivirales, tel que décrit précédemment (Boudreau et al., 2007). Les cellules infectées ont été sélectionnées à sous-confluence, en présence de 10 μ g/ml de puromycine, pendant une dizaine de jours. Les lignées cellulaires stables, démontrant une abolition de l'expression de la sous-unité intégrine $\alpha 7B$, soit Caco-2/15 KD $\alpha 7B$, ont été maintenues en culture dans un milieu DMEM- 10% de sérum de veau fœtal- 1 μ g/ml puromycine.

```

1  ggagcggcgg  gggggcggga  gggctggcgg  ggcgaacgtc  tgggagacgt  ctgaaagacc
61  aacgagactt  tggagaccag  agacgcgcct  ggggggacct  ggggcttggg  gctgcgaga
121  ttcccttgc  attcgtctgg  agctcgcgca  gggatcgctc  ctccgccggg  gctcggagcc
181  gcgacccttg  gggggctcc gggatttgc accttttgg  ctccctgctc  gtcgaactgc
241  tcttctcacg  ggctgtcgcc  ttcaatctgg  acgtgatggg  tgccttgcgc  aaggaggcgg
301  agccaggcag  cctcttcggc  ttctcttggg  cctcgaccg  gcagttgcag  ccccgaccgc
361  agagctggct  gctggtgggt  gctccccagg  ccttggtctc  tcttgggcag  caggcgaaac
421  gcactggagg  cctcttcgct  tgcccgttga  gcttgaggga  gactgactgc  tacagagtgg
481  acatcgacca  gggagctgat  atgcaaaagg  aaagcaagga  gaaccagtgg  ttgggagtca
541  gtgttcggag  ccaggggcct  gggggcaaga  ttgttacctg  tgcacacga tatgaggcaa
601  ggcagcgagt ggaccagatc ctggagacgc gggatatgat tgtcgctgc tttgtgctca
661  gccaggacct ggccatccgg gatgagttgg atggtgggga atggaagtcc tgtgagggac
721  gcccccaagg ccatgaacaa tttgggttct gccagcaggg cacagctgcc gccttctccc
781  ctgatacgca ctacctcctc tttggggc g gggttgcttt
841  ttgtgaccaa  cattgatagc  tcagaccctg  accagctggt  gtataaaact  ttggaccctg
901  ctgaccggct  ccaggagcca  gccggagact  tggccctcaa  tagctactta  ggcttctcta
961  ttgactcggg  gaaaggtctg  gtgcgtgcag  aagagctgag  ctttgtggct  ggagccccc
1021  gcgccaacca  caagggtgct  gtggttatcc  tgcgcaagga  cagcgccagt  cgcttggtgc
1081  ccgaggttat  gctgtctggg  gagcgccctg  cctccggctt  tggctactca  ctggctgtgg
1141  ctgacctcaa  cagtgtatgg  tggccagacc  tgatagtggg  tgcacctac  ttctttgagc
1201  gccaaagaag  gctggggggg  gctgtgtatg  tgtacttgaa  ccaggggggt  cactgggctg
1261  ggatctcccc  ttcccgctc  tgcggctccc  ctgactccat  gttcgggata  agctggctg
1321  tcttggggga  cctcaaccaa  gatggcttcc  catagattgc  agtgggtgcc  cctttgatag
1381  gtgatgggaa  agtcttcac  taccatggga  gcagcctggg  ggttgtcgcc  aaaccttcac
1441  aggtgctgga  gggcgaggct  gtgggcatca  agagcttcgg  ctactccctg  tcaggcagct
1501  tggatatgga  tgggaaccaa  taccctgacc  tgctggtggg  ctccctggct  gacaccgag
1561  tgctcttcag  ggccagagcc  atcctccatg  tctcccatga  ggtctctatt  gttccacgaa
1621  gcactgacct  ggagcagccc  aactgtgctg  gcggccactc  ggtctgtgtg  gacctaaagg
1681  tctgtttcag  ctacattgca  gtccccagca  gctatagccc  tactgtg
1741  ggacacagac cggaggctcc ggggccaggt tcctcgctgt acgttctcta
1801  ggcgtaacct ggaagaaccc aagcaccagg cctcgggcac cgtgtggtgt aagcaccagg
1861  atgaccgagt  ctgtggagac  gccatgttcc  agctccagga  aaatgtcaaa  gacaagcttc
1921  gggccattgt  agtgaccttg  tctacagctc  tcagaccctc  tcggctccgg  cgacaggctc
1981  ctggccaggg  gtgcctcca  gtggcccca  tctcaatgc  ccaccagccc  agcaccagca
2041  gggcagagat  ccacttctg  aagcaaggtc  gtggtgaaga  caagatctgc  cagagcaatc
2101  tgcagctggt  ccacggccc  ttctgtacc  gggtcagcga  cacggaattc  caacctctgc
2161  ccatggatgt  ggatggaaca  acagccctgt  ttgcactgag  tgggcagcca  gtcattggcc
2221  tggagctgat  ggtcaccaac  ctgccatcgg  acccagccca  gccccaggct  gatggggatg
2281  atgcccagga  agcccagctc  ctggtcatgc  ttctgactc  actgcaactc  tcaggggctc
2341  gggccctgga  cctcgcgag  aagccactct  gctgttcaa  tgagaatgcc  tccctgttg
2401  agtgtgagct  ggggaacccc  atgaagagag  gtgccagggt  caccttctac  ctcatcctta
2461  gcacctccgg  gatcagcatt  gagaccacgg  aactggaggt  agagctgctg  ttggccacga
2521  tcagtggaga  ggagctgcat  ccagtctctg  cagcagcccg  tgtcttcat  gtagctgccac
2581  tgtccattgc  aggaatggcc  attcccagc  aactcttctt  ctctggtgtg  gtgaggggcg
2641  agagagccat  gcagtctgag  cgggatgtgg  gcagcaaggt  caagtatgag  gtcacggttt
2701  ccaaccaagg  ccagtgcctc  agaaccctgg  gctctgcctt  ctcaacatc atgtggcctc
2761  aggagattgc  caatgggaag  tggttgctgt  acccaatgca  ggttgagctg  gagggcgggc
2821  aggggcctgg  gcagaaaagg  ctttgtctct  ccaggcccaa  catcctccac  ctggtatgtg
2881  acagtaggga  taggagcgcg  cgggagctgg  agccacctga  gcagcaggag  cctggtgagc
2941  ggcaggagcc  cagcatgtcc  tgggtggcag  tgcctctgc  tgagaagaag  aaaaacatca
3001  ccttggaact  cgccggggg  acggccaaat  gtgtggtgtt  cagctgccca  ctctacagct
3061  ttgaccgcgc  ggctgtgctg  catgtctggg  gccgtctctg  gaacagcacc  ttctggagg
3121  agtactcagc  tgtgaagtcc  ctggaagtga  ttgtccgggc  caacatcaca  gtgaatctcc
3181  gcataaagaa cttgatgctc  cgagatgcct  ccacagtgat  ccagtgatg  gtatacttgg
3241  acccatggc  tgtggtggca  gaaggagtgc  cctgggtgggt catcctcctg gctgtactgg
3301  ctgggctgct ggtgctagca ctgctgggtg tgctcctgtg gagatggga  ttctcaaac
3361  gggcgaaagca  ccccgaggcc  accgtgccc  agtaccatgc  ggtgaagatt  cctcggaag
3421  accgacagca  gttcaaggag  gagaagacgg  gcaccatcct  gaggaacac  tggggcagcc
3481  cccggcggga  gggcccgat  gcacaccca  tcttggtctg  tgacgggat  cccgagctgg
3541  gcccgatgg  gcacccagg  ccaggcaccg  cctaggttcc  catgtccag  cctggcctgt
3601  ggctgcctc  catccttcc  ccagagatgg  ctcttggga  tgaagagggt  agagtggct
3661  gctggtgtcg  catcaagatt  tggcaggatc  ggcttctca  ggggcacaga  cctctccac
3721  ccacaagaac  tctctccacc  caacttccc  tttagagtgt  gtgagatgag  agtgggtaaa
3781  tcagggacag  ggccatgggg  tagggtgaga  agggcagggg  tgcctgatg  caaagtggtg
3841  gagaagggat  cctaattccc  tctctccca  ttcacctgt  gtaacaggac  ccaaggacc
3901  tgctccccg  gaagtgcctt  aacctagagg  gtcggggagg  aggttgtgtc  actgactcag
3961  gctgctcctt  ctctagtctt  ccctctcatc  tgaccttagt  ttgctgcat  cagtctagt
4021  gtttcgtggt  ttcgtctatt  tattaaaaaa  tattttgagaa  caaaaaaa  aaaaaaa

```

shRNA#1

Exon #4

shRNA#2

shRNA#3

shRNA#4

shRNA#5

Transmembrane domain

Figure 12 : Séquence shRNA spécifiques à la sous-unité d'intégrine $\alpha 7B$

2.3 Extraction protéique

Les monocouches de cellules sont lavées avec du PBS (140 mM de NaCl (Fisher); 3 mM de KCl (Fisher); 8 mM de Na₂HPO₄ (J.T.Baker) et 1,5 mM de KH₂PO₄ (J.T.Baker)), puis solubilisées dans un tampon Laemmli (5% SDS; 20% glycérol; 2% Bleu de bromophénol et 1M de Tris-HCl), additionné au besoin avec 5% de β -mercaptoéthanol (Bio-Rad). L'extrait protéique est ensuite soumis à 20 pulsations de sonicateur suivis d'une centrifugation à 15000 rpm pendant 10 minutes, puis chauffé 5 minutes à 95 °C. La concentration protéique est déterminée par un essai colorimétrique selon le procédé de Lowry (Lowry et al., 1951; Noble and Bailey, 2009). Les extraits protéiques sont conservés à -20°C, en vue d'une analyse ultérieure par immunobuvardage.

2.4 Immunobuvardage de type Western

Des quantités équivalentes d'extraits protéiques sont séparées par SDS-PAGE sur gels de Thomas & Kornberg (8% -15%) (Thomas and Kornberg, 1975), sous des conditions réductrices (5% de β -mercaptoéthanol; (Sigma-Aldrich)) ou non réductrices, suivies d'un électrotransfert sur des membranes de nitrocellulose (Bio-Rad) (Benoit et al., 2009; Perreault and Jean-Francois, 1996). Les membranes sont par la suite incubées à température pièce, en présence d'une solution de blocage appropriée aux conditions optimales pour l'anticorps à tester, soit 5% -10% de lait en poudre ou 5% de BSA dans du PBS - 0,1% Tween -20 (Bio-Rad). Les anticorps primaires sont dilués dans la solution de blocage et incubés pendant une nuit soit à 4°C ou à la température de la pièce. Les caractéristiques ainsi que les conditions optimales d'utilisation des anticorps adoptés dans cette étude sont résumés dans le Tableau. 3. Les membranes sont soumises à 3 cycles de lavage de 10 minutes avec du PBS -0,1% Tween 20 ou du PBS avant d'être incubées avec un anticorps secondaire couplé à l'enzyme HRP. Les anticorps anti- souris et anti- lapin (Amersham) sont dilués à 1/5000, l'anti- chèvre (Santa Cruz Biotech) et l'anti- rat (Amersham) sont dilués respectivement à 1/3000 et 1/10000. Les anticorps sont dilués dans la même solution de blocage utilisée tout le long du procédé et incubés à température

pièce pour 1 heure. Le signal est par la suite détecté via le système Immobilon Western® (Millipore).

Tableau. 3 : Anticorps utilisés en immunobuvardage de type Western

| Anticorps/ Source | Détails/ Fournisseur | Dilution |
|-----------------------------------|---------------------------|----------|
| Anti- α 7/ Lapin | Dr.Engvall | 1 :1000 |
| Anti- SI/ Souris | HSI-14/ Dr.Beaulieu | 1 :10 |
| Anti- actine/ Souris | C4/ Chemicon | 1 :80000 |
| Anti- K18/ Souris | CY90/ Sigma | 1 :20000 |
| Anti- E-cadhérine/ Souris | BD Transduction lab | 1 :20000 |
| Anti- Villine/ Souris | BD Biosciences | 1 :3000 |
| Anti- Cdx-2/ Souris | 88/ Biogenex | 1 :500 |
| Anti- HNF-1 α / Chèvre | Santa Cruz Biotech | 1 :1000 |
| Anti- HNF-4 α / Chèvre | Santa Cruz Biotech | 1 :2000 |
| Anti- DPPIV/ Souris | | 1 :500 |
| Anti- p27 ^{KIP1} / Lapin | Santa Cruz Biotech | 1 :2000 |
| Anti- H3K27me3/ Lapin | Millipore | 1 :2000 |
| Anti- LKB1/ Souris | Abcam | 1 :1000 |
| Anti- Src total/ | Cell Signaling Technology | 1 :1000 |
| Anti- pSrc Y416/ | Cell Signaling Technology | 1 :1000 |

2.5 Extraction d'ARN

L'ARN total issu de cellules ou de fractions épithéliales et mésenchymateuses est extrait selon la méthode TriPure (Roche, Laval, Qc). Les tissus intestinaux intacts sont traités selon le protocole de Clontech's Atlas Isolation (Clontech, Palo Alto, CA, USA). L'ARN isolé est conservé dans du RNasecure (Ambion, Austin, TX, USA) à -80°C. L'intégrité de l'ARN résultant est confirmée par l'analyse visuelle des ARNr 28S et 18S sur gel d'agarose qui contient du bromure d'éthidium. La quantification de l'ARN total est réalisée par spectrophotométrie à 260 nm (Beckman Industries, USA), moyennant le kit RiboGreen RNA Quantification (Molecular Probes, Hornby, ON, Canada).

2.6 RT-PCR

La synthèse de l'ADNc est assurée à partir de 2µg d'ARN total, moyennant l'enzyme omniscrypt reverse transcriptase (Qiagen) en présence, d'une combinaison d'oligo(dT) 12-18 et d'hexamères (Amersham Pharmacia, Baie d'Urfé, QC, Canada) comme amorces, 500 µM de dNTP (GE Healthcare, Baie d'Urfé, QC, Canada) et 9 unités de RNAGuard (GE Healthcare), le tout est incubé pour 1 heure à 37°C (Ni et al., 2005). Les conditions d'amplification de la sous-unité $\alpha 7$, la sucrase-isomaltase, HNF-4 α , HNF-1 α , la villine et RPLPO ont été effectuées telles que décrites précédemment (Basora et al., 1997; Benoit et al., ; Dydensborg et al., 2009b). Les réactions d'amplification s'opèrent avec l'appareil iCycler Thermal Cycler (Bio-Rad) et un nombre minimum de cycles est déterminé pour chaque paire d'amorces. Les produits d'amplification sont analysés sur gel d'agarose/TAE 1.5-2% (w/v), visualisés sous une lampe UV par un marquage au bromure d'éthidium et photographiés par une caméra Alphamager 1200 documentation and archiving system (Bio-Rad Laboratories and canberra Packard, Mississauga, ON, Canada). Un marqueur de 100 Bp (GE Healthcare) est utilisé comme standard afin de déterminer la taille du produit obtenu. L'utilisation du logiciel Scion corporation permet de déterminer la densité optique (OD)/mm² pour chaque produit d'amplification. Les valeurs obtenues

pour chaque gène d'intérêt sont reportées par rapport au OD du gène contrôle en vigueur. L'information sur les paires d'amorces testées est présentée dans le Tableau. 4.

2.7 RT-PCR quantitatif

Les expériences de PCR quantitatif sont effectuées avec un appareil thermocycleur Mx3000P QPCR System (Stratagene, la jolla, CA, USA), tel que rapporté précédemment (Dydenborg et al., 2006; Escaffit et al., 2005a). Chaque mélange réactionnel est constitué de d'ADNc issu de 10 ng d'ARN total, 10 µl du 2X Brilliant SYBR Green QPCR master Mix (Stratagene) et 10µM de chacune des amorces testées dans un volume total de 20 µl. L'efficacité des réactions de PCR quantitatif, déterminée à l'aide de courbes standards, se situe entre 90% et 110%. L'information sur les paires d'amorces testées est présentée dans le Tableau. 4.

Tableau. 4: Séquences des amorces testées en PCR

| Gène | Amorce « sens » | Amorce « anti-sens » |
|---------------|----------------------------|-----------------------------|
| Intégrine α7B | 5'-GTCTCTGGAACAGCACTTTC-3' | 5'-GTCCGACGAGGAAGAGATCAA-3' |
| SI | 5'-GAGGACACTGGCTTGGAGAC-3' | 5'-ATCCAGCGGGTACAGAGATG-3' |
| Src | 5'-GCTGACTGACTCACCACAA-3' | 5'-CGGTGGACGTGAAGTAGTCC-3' |
| Fyn | 5'-ACGGGAGGTTCAATCAAG-3' | 5'-AGGGTCCTTTTCCAGCAGT-3' |
| Lyn | 5'-TGATGTGTGGTCCTTTGGAA-3' | 5'-CTGCCTTTTCTTTCCAGCAC-3' |
| RPLPO | 5'-GCAATGTTGCCAGTGTCTG-3' | 5'-GCCTTGACCTTTTCAGCAA-3' |

2.8 Immunofluorescence

Dans cette étude, tous les essais d'immunofluorescences ont été réalisés sur des cellules ensemencées sur des lamelles de verre préalablement enduites avec du sérum de veau fœtal. Les cellules sont maintenues en culture, en condition standard, jusqu'à 3 jours post-confluence. La procédure de détection des protéines d'intérêt par immunofluorescence débute par un bref rinçage de la monocouche cellulaire avec du PBS 1X, suivie d'une étape de fixation dans du méthanol 100%, éthanol 100% (10 minutes à -20°C) ou paraformaldéhyde 2% (1 heure à 4°C) dépendamment de l'anticorps utilisé (Beaulieu, 1992; Beaulieu and Quaroni, 1991; Perreault et al., 1995). Les anticorps, primaire et secondaire, sont tous deux dilués adéquatement dans la solution ayant servi pour l'étape préalable de blocage (30 minutes à température de la pièce), soit du PBS 1X- 5% de lait en poudre sans lipide (Nestlé) ou PBS 1X- 2% BSA, et incubés pendant 1 heure à température de la pièce. Les caractéristiques des anticorps ainsi que les conditions d'utilisation sont résumées dans le Tableau. 5. Après les lavages, les lamelles chargées de cellules sont montées sur une lame en verre avec du milieu de montage (Glycérol : PBS (9 :1) + 0,1% de paraphénylenediamine), tel que décrit précédemment. L'observation microscopique se fait à l'aide d'un microscope Reichart Polyvar 2 (Leica, St-Laurent, QC, Canada). Pour tous les essais, aucun marquage n'a été détecté dans les contrôles négatifs.

Tableau. 5 : Anticorps utilisés dans les essais d'immunofluorescences

| Anticorps/ Source | Détails/ Fournisseur | Dilution |
|-------------------------------|----------------------|----------|
| Sérum Anti- α 7/ Lapin | Dr.Engvall | 1 :100 |
| Anti- SI/ Souris | HSI-14/ Dr.Beaulieu | N.D |
| Anti- E-cadhérine/ Souris | BD Transduction lab | 1 :500 |
| Anti-ZO-1/ Lapin | Zymed | 1 :250 |

2.9 Courbes de prolifération

Les cellules sontensemencées au préalable dans des boîtes de Pétri de 35mm² (Falcon®, Beckton Dickinson Labware, Franklin Lakes, NJ, USA), avec une densité de départ de 1×10^5 cellules par boîte. Après 3, 5 et 7 jours post-ensemencement, les cellules sont mises en suspension moyennant la pur trypsin (Clonetics, walkersville, MD, USA) et la trypsin neutralizing solution (TNS; Clonetics, Walkersville, MD, USA). Le nombre de cellules total par boîte est déterminé moyennant un appareil compteur de particule Z1 Coulter Counter (Beckman Instruments Inc., Mississauga, ON, Canada). A fin de prévenir les erreurs de comptage et de pipetage, 3 boîtes sont préparées pour chaque stade et chaque boîte est comptée individuellement.

2.10 Microscopie électronique

L'analyse ultrastructurale a été effectuée tel que décrit précédemment. Les cellules ont été cultivées jusqu'à 3 jours post-confluence. Les monocouches cellulaires sont lavées avec un tampon 0,1 M de cacodylate de sodium (pH 7,4), suivi d'une fixation au glutaraldéhyde 2,5% pour 1 heure à la température de la pièce. Les cellules sont par la suite post-fixées dans une solution de tétroxyde d'osmium 2% puis déshydratées dans une étuve. Pour l'analyse par microscopie électronique à transmission les échantillons sont inclus dans une résine de type Epon-araldite et des coupes ultra-minces y sont générées. Les coupes sont observées par un microscope électronique à transmission de type Hitachi 7500 (Perreault and Beaulieu, 1998; Quaroni and Beaulieu, 1997; Vachon and Beaulieu, 1992).

2.11 Essais de transfection FuGENE

Les cDNA de souris de la sous-unité $\alpha 7B$ (cDNA3 $\alpha 7X1$ et cDNA3 $\alpha 7X2$) utilisés dans cette étude nous ont été fourni par l'équipe du Dr Van Der Mark

(Echtermeyer et al., 1996). Les cellules Caco-2/15 sh α 7 ont été transfectées selon la technique FuGENE. Une quantité de 1 μ g d'ADN totale est utilisée pour la transfection d'environ 2x10⁶ cellulesensemencées 24 heures plutôt dans des boîtes de pétri de 60mm. Le contact de l'ADN et le FuGENE est effectué selon les recommandations du fabricant. Le mélange est déposé sur les cellules qui sont ensuite placées à 37C et le milieu de culture est changé 48 heures plutard.

2.12 Traitement aux inhibiteurs de signalisation

Les cellules Caco-2/15 sont cultivées tels que décrit précédement. Au jour 0 de la confluence cellulaire, les cellules sont traitées avec 20 μ M de PP2 directement dans le milieu de culture. PP2 est un inhibiteur pharmacologique spécifique pour la voie de signalisation Src. Le milieu de culture est changé quotidiennement pour une durée totale de traitement de 72 heures. Les extractions de l'ARN total et des protéines sont effectuées selon les procédés décrits précédemment.

Résultats

Dans l'étude initiale de Basora et al., les auteurs ont observé une augmentation ponctuelle des niveaux d'expression de la sous-unité $\alpha 7B$ dans les cellules Caco-2/15 en cours de différenciation et ce, tant au niveau de l'ARN messager qu'au niveau protéique (Basora et al., 1997). Le pic d'expression était observé au stade de culture de 3jpc et correspond au début de l'expression de la SI, un marqueur spécifique de la différenciation des cellules épithéliales intestinales. Ainsi, dans la présente étude nous avons ciblé le stade de culture de 3 jpc pour identifier le rôle exact de l'intégrine $\alpha 7B\beta 1$ dans le programme de différenciation épithéliale intestinale.

3.1 La perte d'expression de la sous-unité $\alpha 7B$ influence l'état de différenciation des cellules Caco-2/15.

Dans le but d'identifier l'implication de la sous-unité $\alpha 7B$ dans le programme de différenciation des cellules Caco-2/15, différentes séquences de shARN spécifique à l'ARNm de la sous-unité $\alpha 7B$ ont été mis au point. Les séquences de ces shARN ainsi que les régions qu'ils ciblent sont décrits dans la section matériel et méthodes. Par le biais d'infections lentivirales, nous avons réussi à inhiber l'expression de la sous-unité $\alpha 7B$ dans les cellules Caco-2/15. L'efficacité de répression des shARN a été vérifié par des essais d'immunobuvardage de type western blot (Figure 13A). En effet, lorsque comparée aux contrôles Caco-2/15 shCTL et Caco-2/15 natifs (wt), une baisse importante de l'expression de la sous-unité $\alpha 7B$ est observée et ce, pour les cellules Caco-2/15 exprimant les shARN #2 et #3. Les baisses des niveaux d'expression sont conséquentes tant au niveau du polypeptide immature de la

sous-unité $\alpha 7B$ ($\alpha 7(I)$) qu'au niveau du polypeptide mature ($\alpha 7(M)$), observés respectivement à 121 Kilodaltons (forme pleine longueur) et 38 kilodaltons (portion carboxyterminale) (Figure 13A) (Basora et al., 1997; Song et al., 1992).

Le maintien de la baisse des niveaux d'expression de la sous-unité $\alpha 7B$ ($\alpha 7(M)$) dans les lysats protéiques totaux des cellules Caco-2/15 sh $\alpha 7B$ (2) et (3) après sélection et congélation, confirme l'établissement de deux lignées cellulaires stables dans lesquelles l'expression de la sous-unité $\alpha 7B$ est réprimée (Figure 13B). Par ailleurs, la répression de l'expression quasi-totale de la sous-unité $\alpha 7B$ dans les cellules sh $\alpha 7B$ (2) et (3), s'accompagne d'une augmentation drastique de l'expression de la SI et ce, dès l'atteinte de la confluence (1jpc). L'estimation des niveaux d'expression de la SI observée dans les lignées cellulaires sh $\alpha 7B$ à 3 jpc, sont équivalents voire même supérieures au maximum d'expression observée dans les Caco-2/15 natifs entre 20 et 30 jpc (Figure 13B). Dans ce même contexte, des essais de PCR quantitatifs montrent une baisse relative significative de 60 et 80 % des niveaux d'expression de l'ARNm la sous-unité $\alpha 7B$ (Figure 13C), observés respectivement dans les lignées sh $\alpha 7B(2)$ et (3). Cette baisse est associée à une augmentation de plus de 3 et 5 fois des niveaux d'expression de l'ARNm de la SI (Figure 13D), ces chiffres sont donnés à titre comparatif relatif aux cellules shCTL (Figure 13C et 13D).

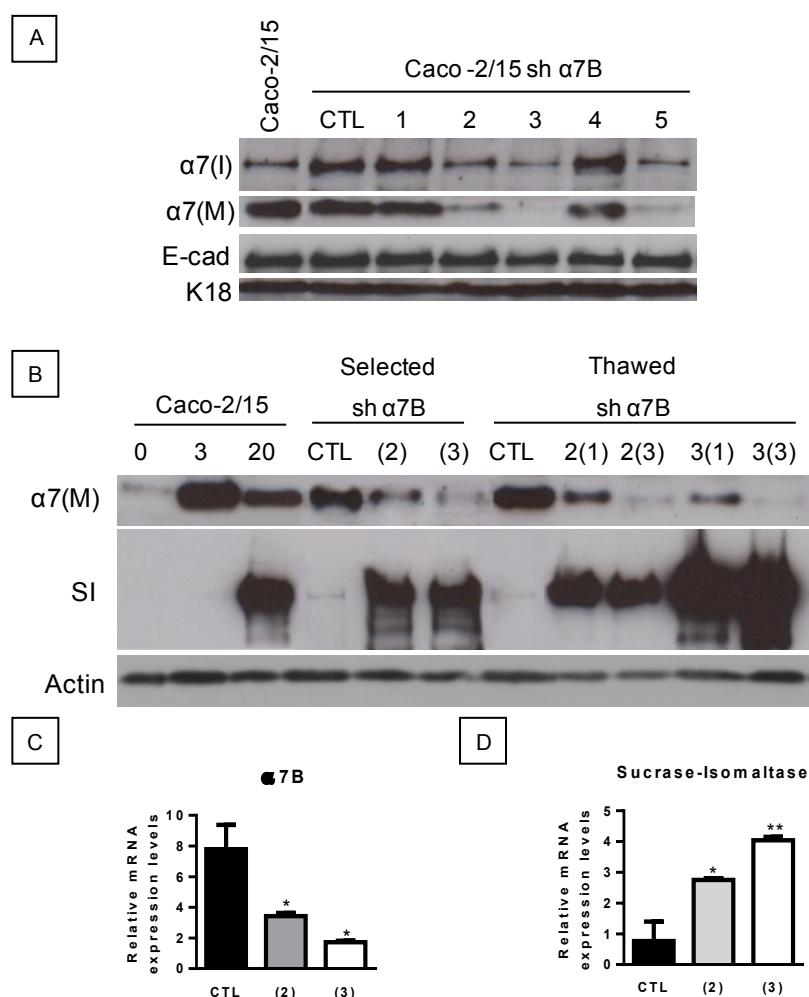


Figure 13 : Influence de l'inhibition de l'expression de la sous-unité α7B sur l'état de différenciation des cellules Caco-2/15.

(A) L'abolition de l'expression de la sous-unité α7B par shARN, a été confirmée par immunobuvardage chez les cellules Caco-2/15 shα7B à 3 jours post confluence (jpc), comparativement aux cellules Caco-2/15 shCTL (CTL) de même stade. L'expression de la cytokératine 18 (K18) a été analysée comme contrôle de normalisation. **(B)** Une analyse représentative par immunobuvardage des extraits de protéines totales, issus des lysats de cellules Caco-2/15 shα7B (2) et (3) aux stades de confluenes de (1) et (3) jpc. Ces extraits sont analysés pour l'expression de la sous-unité α7B (α7(M)) et de la sucrase-isomaltase (SI) **(C)** Des analyses en PCR quantitatif illustrent les différences d'expression des ARNm de la sous-unité α7B et **(D)** de la sucrase-isomaltase dans les cellules Caco-2/15 shα7B(2), (3) et Caco-2/15 shCTL. Les résultats représentent la moyenne ± SE, résultant de trois expériences indépendantes. Les astérisques représentent les différences statistiques significatives, *:p≤0,05, **:p≤0,01, ***: p≤0,001.

3.2 La perte d'expression de la sous-unité $\alpha 7B$ s'associe à une accélération du programme de différenciation des cellules Caco-2/15.

Dans le but d'identifier l'étendue de la perte d'expression de la sous-unité $\alpha 7B$ sur la différenciation entérocytaire, nous avons ciblé l'expression protéique d'autres marqueurs biochimiques de la différenciation fonctionnelle des cellules absorbantes humaines matures dont la dipeptidyl peptidase IV (DPPIV) et la villine. Nous avons aussi vérifié l'expression des effecteurs transcriptionnels de la machinerie de différenciation entérocytaire suivant : CDX-2, HNF-1 α et HNF-4 α . Des essais en immunobuvardage de type western ont confirmé la diminution statistiquement significative de l'expression protéique de la sous-unité $\alpha 7B$ dans les cellules Caco-2/15 sh $\alpha 7B$ (2) et (3) comparativement aux cellules contrôles Caco-2/15 shCTL (Figure 14A, 14C), baisse qui s'accompagne par une hausse rapide et significative des niveaux d'expression protéique de la SI (Figure 14A, 14B), de la DPPIV (Figure 14A, 14D) et de la villine (Figure 14A, 14E).

Des modulations significativement élevées dans l'expression protéique des facteurs de transcription CDX-2 (Figure 14A, 14F), HNF-1 α (Figure 14A, 14G) et HNF-4 α (Figure 14A, 14H) sont aussi observées dans les cellules sh $\alpha 7B$ en comparaison avec les cellules shCTL. Dans la littérature, on décrit l'action concertée de ces différents facteurs de transcription comme essentielle à l'enclenchement du processus de différenciation entérocytaire (Benoit et al., 2010; Boudreau et al., 2002). En effet, l'interaction physique des facteurs de transcription CDX-2/ HNF-1 α a été démontrée importante à la transactivation de l'expression des gènes de la SI et de la lactase-phlorizine hydrolase (Benoit et al., 2010). De même, HNF-1 α a été décrit comme étant associé à un rôle crucial dans l'expression des gènes de la DPP-IV et la fatty acid binding protein (Bosse et al., 2007).

Ces résultats suggèrent que la perte de la fonctionnalité de la sous-unité $\alpha 7B$ chez les cellules Caco-2/15 entraîne une exécution précoce de leur programme de différenciation entérocytaire.

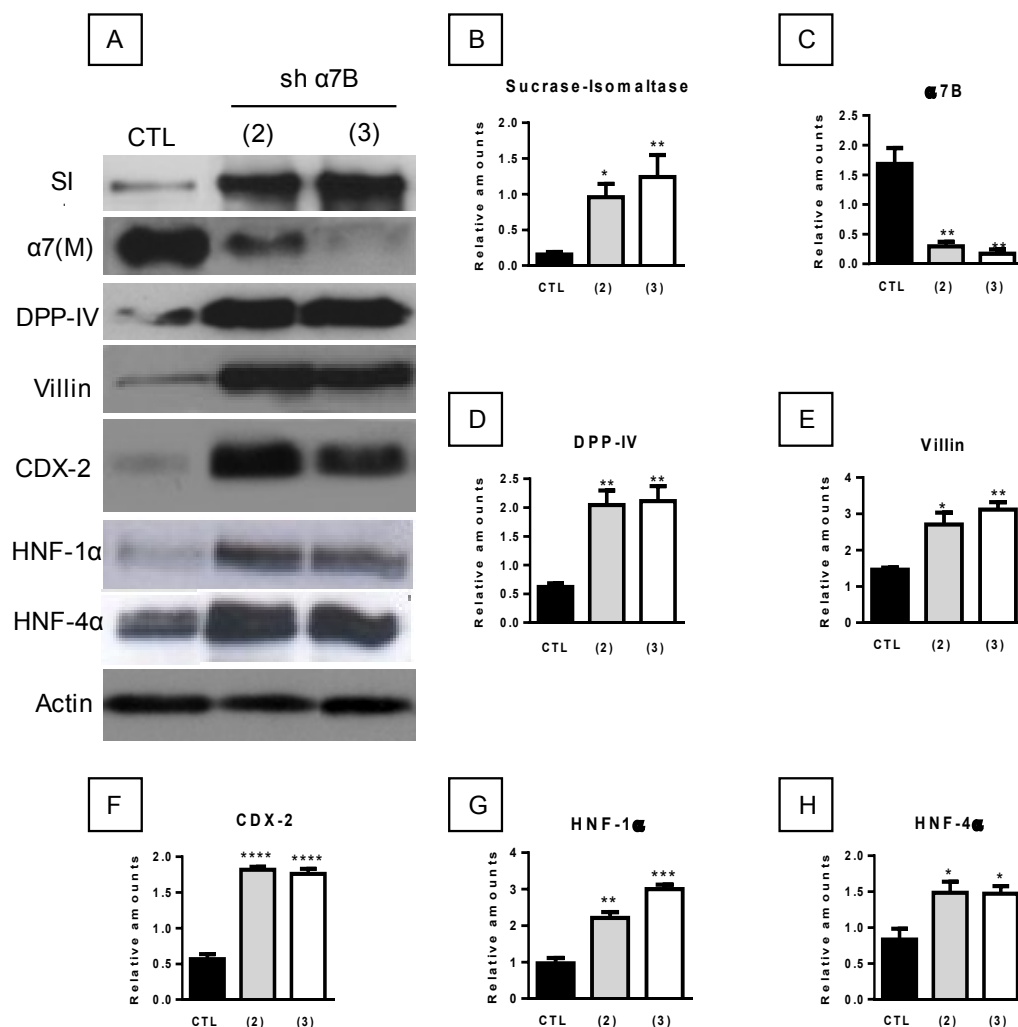


Figure 14: La répression de la sous-unité α7B accélère le processus de différenciation entérocytaire.

(A) Représentation d'une analyse par immunobuvardage de type western d'extraits de protéines totales, issus de lysats de cellules Caco-2/15 shα7B (2) et (3) récoltés à (3) jpc, analysés pour l'expression de la SI, la sous-unité α7B (α7(M)), DPP-IV, la villine, CDX-2, HNF-1α et HNF-4α, comparativement aux cellules CTL au même stade de confluence. L'expression de l'actine a été analysée comme contrôle de normalisation. **(B-H)** Estimation des quantités relatives de la SI **(B)**, la sous-unité α7B **(C)**, DPP-IV **(D)**, la villine **(E)**, CDX-2 **(F)**, HNF-1α **(G)** et HNF-4α **(H)**, par analyses densitométriques des niveaux d'expression observés en immunobuvardage. Les quantités relatives représentent le ratio de la protéine d'intérêt par rapport à celui de l'actine. Les résultats représentent la moyenne ± SE, résultant de trois expériences indépendantes. Les astérisques représentent les différences statistiques significatives, *:p≤0,05, **:p≤0,01, ***: p≤0,001.

3.3 Influence de la perte de la fonctionnalité de l'intégrine $\alpha 7 \beta 1$ sur la différenciation morphologique des cellules Caco-2/15.

Il est connu que dans des conditions de culture standard, les cellules Caco-2/15 forment une monocouche confluite. Aussi sur une période de 20-40 jpc, elles acquièrent graduellement les caractéristiques de la différenciation terminale des cellules entérocytaires matures. Différentes études comparatives examinant le processus de la différenciation des cellules Caco-2/15 ont rapporté une hétérogénéité transitoire dans l'organisation ultrastructurale de la bordure en brosse entre 0 et 20 jpc, en concomitance avec un patron d'expression en mosaïque et transitoire de la SI (Beaulieu and Quaroni, 1991; Hauri et al., 1985; Seltana et al., 2011; Vachon and Beaulieu, 1992).

3.3.1 Caractérisation des cellules Caco-2/15 *sh $\alpha 7$ B* en microscopie électronique à transmission.

Le processus de différenciation morphologique et fonctionnelle des cellules Caco-2/15 *sh $\alpha 7$ B* a été examiné au niveau cellulaire par des essais en microscopie sur des monocouches de cellules fixées à 3 jpc. Des observations en microscopie électronique à transmission, comparant les cellules *sh $\alpha 7$ B* aux cellules *shCTL*, montrent des différences dans l'état de polarisation des cellules (Figure 15). Tel qu'illustré dans la Figure 15A, les cellules *shCTL* à 3jpc présentent une surface apicale peu structurée, des points d'adhésion cellule-cellule naissantes et une morphologie faiblement polarisée. De manière surprenante, les cellules *sh $\alpha 7$ B* sont déjà dressées en forme cuboïdale au sein de la monocouche, montrant un stade de polarisation nettement plus avancé (Figure 15B). De plus, on observe clairement au niveau des espaces intercellulaires des cellules *sh $\alpha 7$ B* les trois structures jonctionnelles distinctes. En effet, au niveau des membranes latérales des cellules adjacentes, et en partant de l'extrémité de la face apicale vers la face basale, on distingue des structures denses représentant dans l'ordre les jonctions serrées (ZO), les jonctions adhérentes (ZA) et les

desmosomes (Figure 15C). Au niveau de la surface apicale de la cellule shCTL les microvillosités sont relativement rares et courtes (Figure 15D) alors que leurs densités et leurs longueurs augmentent significativement dans les cellules sh α 7B (Figure 15E).

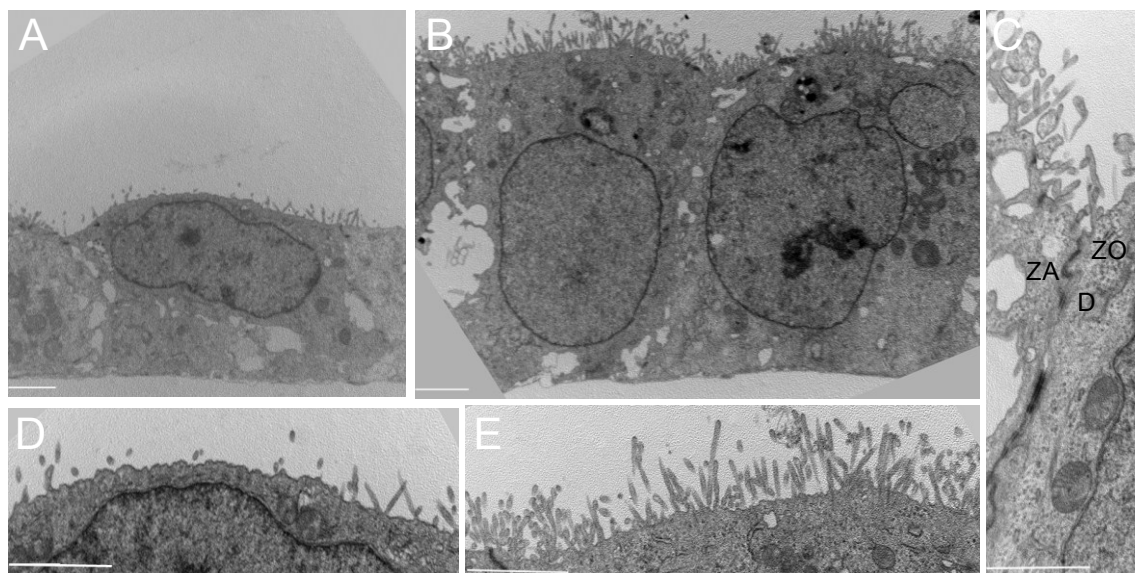


Figure 15: Représentation de la microscopie électronique à transmission des cellules Caco-2/15 sh α 7B.

Micrographies électroniques à transmission de coupe mince de monocouche de cellules shCTL (**A et D**) et de cellules Caco-2/15 sh α 7B (3) (**B,C et E**), à 3 jpc, (Barres (A et B)= 5 μ m, barres (C-E)= 1 μ m).

3.3.2 Caractérisation des cellules Caco-2/15 sh α 7B en microscopie par immunofluorescence indirecte.

L'utilisation d'un sérum spécifique pour la détection de la sous-unité α 7B dans des essais en immunofluorescence indirecte, nous a permis de confirmer la perte d'expression de la sous-unité α 7B à la surface des cellules sh α 7B (2) et (3) (Figure 16B et 16C Respectivement) comparativement au cellules shCTL (Figure 16A).

L'immunodétection de la SI suggère une meilleure organisation des surfaces apicales des cellules sh α 7B, ainsi qu'une plus grande maturation en comparaison avec les cellules shCTL. En outre, tel qu'illustré dans la Figure 16D, les cellules shCTL sont faiblement marquées pour la SI. En effet, les cellules positives pour l'expression de la SI affichent un patron en mosaïque et sont dispersées en petits groupements sur la monocouche cellulaire (Insert Figure 16D). Par ailleurs, le marquage de la SI est plus homogène dans les cellules sh α 7B (2) et (3) (Figure 16E et 16F). De plus, l'immunomarquage de la SI suggère une plus grande maturation de la bordure en brosse dans les cellules sh α 7B (Figure 16E, 16F) et ce, en comparaison avec les cellules shCTL (Figure 16D). De surcroît, la majorité des cellules sh α 7B au sein de la monocouche expriment la SI (Insert Figure 16E et 16F).

L'expression et la distribution des marqueurs jonctionnels ont aussi été investigués. Les immunomarcages de ZO-1, une composante du complexe de jonction serrée, et de l'E-cadhérine, une composante du complexe de jonction adhérente, sont observés tout autour de la cellule, dans les surfaces d'adhésion cellule-cellule (Figure 16G – 16L). L'inhibition de la sous-unité α 7B dans les cellules Caco-2/15 n'a pas affecté la localisation des protéines jonctionnelles. Cependant, les cellules sh α 7B montrent une plus grande concentration de ZO-1 (Figure 16H, 16I) et de l'E-cadhérine (Figure 16K, 16L) dans les zones de contact cellule-cellule et ce, en comparaison aux cellules shCTL (Figure 16G, 16J). De plus, l'immunodétection des composantes jonctionnelles dévoile une caractéristique propre aux cellules sh α 7B. En effet, les cellules sont plus serrées et présentent des membranes latérales difformes; ce qui permet de penser à la présence d'inter-digitations membranaires, témoignant d'une plus grande cohésion au sein des monocouches des cellules sh α 7B (Figure 16H, 16I, 16K et 16L).

Ces résultats suggèrent que la perte de la fonctionnalité de l'intégrine α 7B β 1 dans l'intestin humain entraîne non seulement une accélération de la différenciation entérocytaire biochimique mais aussi enclenche une maturation

morphologique et une polarisation précoce des cellules Caco-2/15 et ce, dans un délai dix fois plus court que dans les conditions standards.

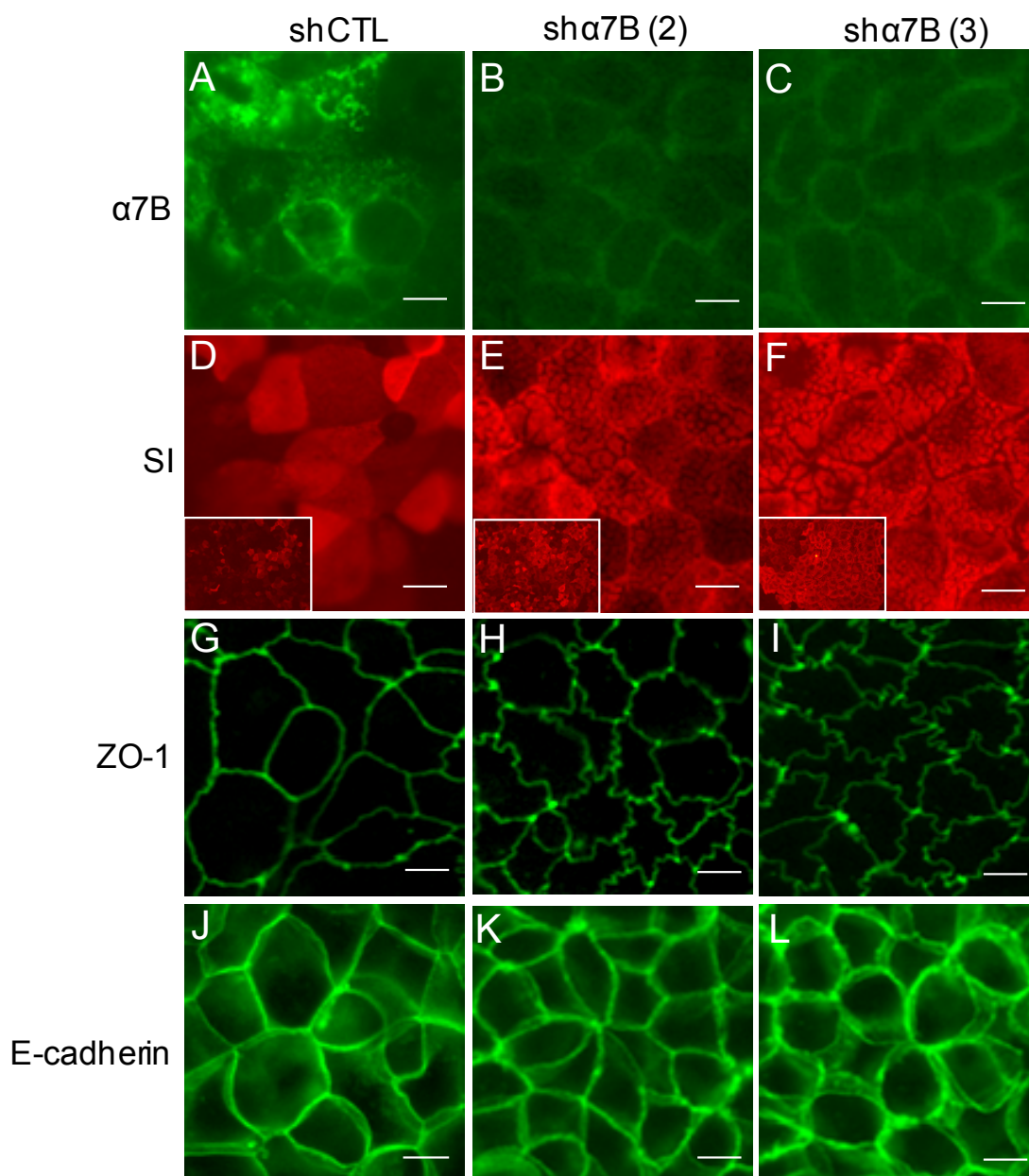


Figure 16: Représentation de la microscopie par immunofluorescence indirecte des cellules Caco-2/15 sha7B.

Micrographies représentatives obtenues par immunofluorescence, comparant des cellules fixées shCTL (**A, D, G et J**) aux cellules sha7B (2) (**B, E, H et K**) et (3) (**C, F, I et L**) en culture à 3 jpc. Les cellules ont été incubées avec différents anticorps spécifiques pour la détection de: la sous-unité $\alpha 7B$ (**A, B et C**), la SI (**D, E et F**), ZO-1 (**G, H et I**) et la E-cadhérine (**J, K et L**), (Barres= 25 μ m).

3.4 Étude de la croissance des cellules Caco-2/15 sh α 7B.

L'arrêt de la croissance cellulaire et la différenciation sont généralement considérés comme deux phénomènes inversement liés dans le temps et de manière fonctionnelle au sein de l'épithélium intestinal (Sancho et al., 2003). Ainsi, l'arrêt de la croissance cellulaire corrèle avec le début du processus de différenciation. D'autre part, l'intégrine α 7 β 1 a été décrite comme un inhibiteur de la prolifération cellulaire au profit d'un remodelage vasculaire dans les cellules du muscle lisse (Welser et al., 2007).

La croissance des cellules sh α 7B (2), (3) et des cellules shCTL, a été suivie sur une période de 7 jours de culture. Tel qu'illustré dans la Figure 17A, les trois lignées cellulaires suivent des courbes de croissance très proches. En effet, les cellules sh α 7B ne montrent pas de défaut de prolifération lorsque comparées aux cellules shCTL (Figure 17A). Ce qui démontre que la perte de la fonctionnalité de l'intégrine α 7 β 1 n'est nullement associée à un défaut de la croissance cellulaire dans l'intestin.

L'expression protéique d'un inhibiteur du cycle cellulaire p27^{kip1}, a été analysée par des essais en immunobuvardage. Lors de l'arrêt de croissance des cellules Caco-2/15, le rôle p27^{kip1} consiste à la sous-régulation de la « *cyclin dependent kinases 2* » (Cdk2), qui va de pair avec l'activation des protéines Rb, (Deschenes et al., 2001). Une augmentation significative des niveaux d'expression protéique de p27^{kip1} est observée dans les cellules sh α 7B (2) et (3), comparativement aux cellules shCTL (Figure 17B). Cependant, cette augmentation est vraisemblablement insuffisante pour induire un arrêt ou un défaut de la croissance cellulaire et ce, malgré l'état de différenciation conséquent des cellules sh α 7B.

Dans la littérature, p27^{kip1} a été largement abordée pour sa fonction inhibitrice du cycle cellulaire. Par ailleurs, dans l'épithélium intestinal humain, outre son action sur les kinases dépendantes des cyclines (Cdks) elle est spécifiquement requise pour la différenciation cellulaire fonctionnelle. En effet, on rapporte que l'expression de p27^{kip1} corrèle avec l'activité du promoteur et

l'expression de la SI dans les cellules Caco-2/15, au cours de la différenciation entérocytaire (Deschenes et al., 2001). Ces études confirment la justesse de nos observations et soutiennent l'hypothèse d'un cheminement accéléré de l'ensemble du programme de différenciation entérocytaire par les cellules Caco-2/15 sh α 7B.

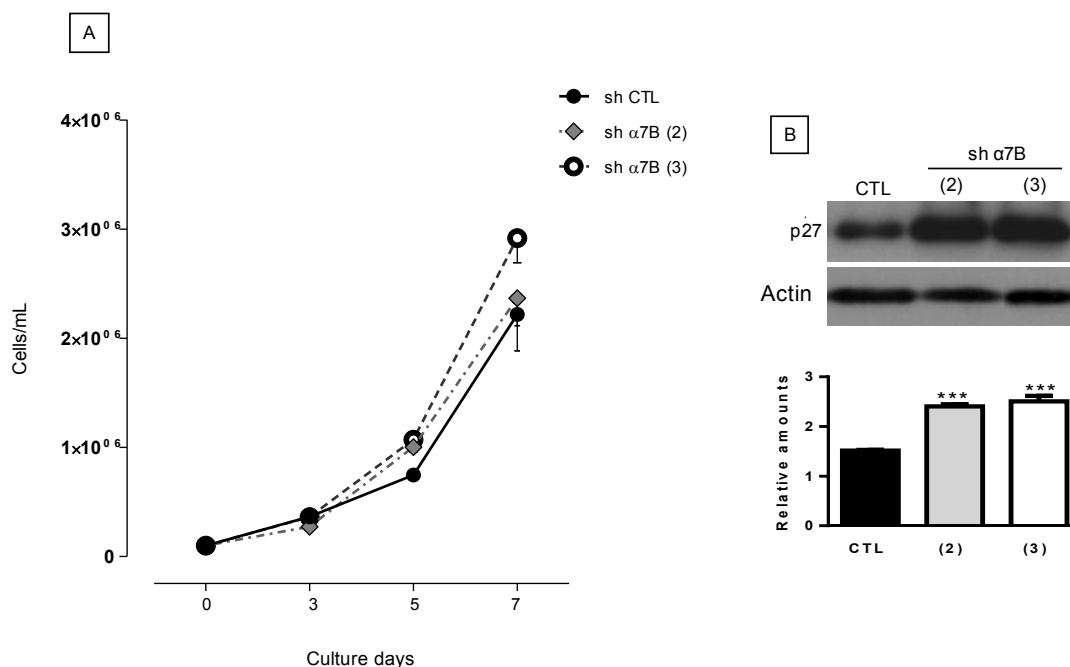


Figure 17: L'abolition de l'expression de la sous-unité α 7B dans les cellules Caco-2/15 n'affecte pas la prolifération cellulaire.

(A) Représentation des courbes de prolifération montrant le nombre de cellules/ml en fonction du temps de culture des cellules Caco-2/15 shCTL, en comparaison aux cellules sh α 7B (2) et (3). Le comptage des cellules est réalisé à différents temps de culture 0, 3, 5 et 7 jours post ensemencement. **(B)** Les niveaux d'expression de p27^{Kip1} dans les cellules Caco-2/15 sh α 7B (2) et (3) en culture jusqu'à 3 jpc, comparativement aux cellules shCTL de même stade de confluence, sont représentés par un immunobuvardage de type western. L'expression de l'actine a été analysée comme contrôle de normalisation. **(B)** Estimation des quantités relatives de p27^{Kip1}, par analyses densitométriques des niveaux d'expression observés en immunobuvardage. Les résultats représentent la moyenne \pm SE, résultant de trois expériences indépendantes. Les astérisques représentent les différences statistiques significatives, ***: $p \leq 0,001$

3.5 Expression du variant extracellulaire $\alpha 7X2$ dans l'épithélium intestinal.

Une plus grande diversité a été introduite à l'intégrine $\alpha 7\beta 1$ par la découverte de nouveaux variants de la sous-unité $\alpha 7$. L'identification de variants cytoplasmiques (A et B) et extracellulaires (X1 et X2) issus d'épissages alternatifs de la sous-unité $\alpha 7$ a permis de mieux comprendre le rôle de l'intégrine $\alpha 7\beta 1$ dans le muscle (Song et al., 1993; Vignier et al., 1999).

Nous avons investigué l'expression des variants extracellulaire X1 et X2 de la sous-unité $\alpha 7B$ par des essais d'amplification de l'ARN dans différents extraits tissulaires de l'intestin humain : (1) l'intestin intact, (2) le muscle lisse, (3) le mésenchyme et (4) l'épithélium. Les résultats illustrés dans la Figure 18A, montrent la présence des deux variants extracellulaires de la sous-unité $\alpha 7B$ dans l'intestin. Cependant, seul le variant $\alpha 7X2$ est exprimé dans l'épithélium intestinal. Des essais de digestion enzymatiques spécifiquement dirigés ont confirmé l'expression du variant extracellulaire $\alpha 7BX2$ dans les extraits d'ARN d'épithélium intestinal (Figure 18B) et de cellules Caco-2/15 (Figure 18C).

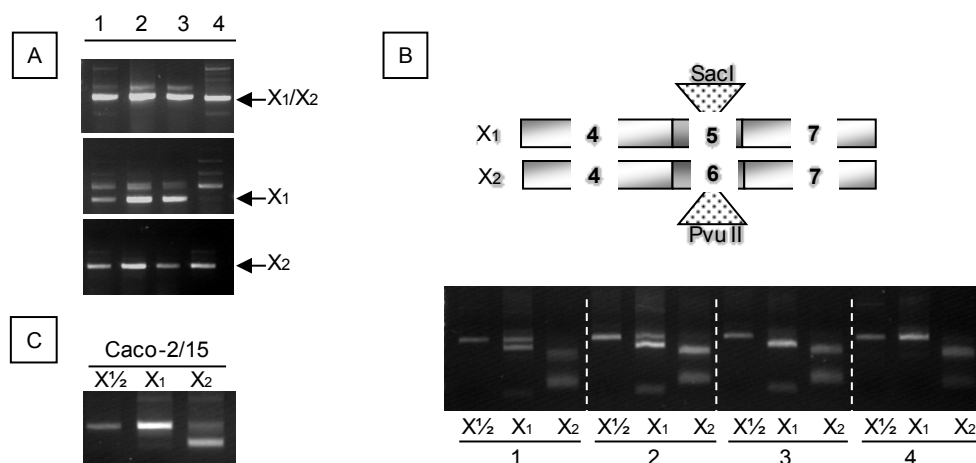


Figure 18 : Expression du variant extracellulaire $\alpha 7BX2$ dans l'épithélium de l'intestin humain.

(A) Analyse de l'expression des différents isoformes extracellulaires de la chaîne $\alpha 7B$ dans différents extraits tissulaires de l'intestin humain : (1) l'intestin intact, (2) le muscle lisse, (3) le mésenchyme et (4) l'épithélium a été investiguée par des essais d'amplification de l'ARN. Les isoformes X1/X2 sont présentes dans l'intestin avec une prédominance de l'isoforme X2 dans l'épithélium. **(B - C)** Des digestions enzymatiques, dirigées contre l'exon 5 et 6 correspondant respectivement aux isoformes X1 et X2, confirment l'absence d'expression de l'isoforme X1 et l'expression de l'isoforme X2 dans l'extrait d'ARN de l'épithélium intestinal **(B)**, ainsi que dans les cellules Caco-2/15 **(C)**.

3.6 Étude de l'impact d'une expression forcée de la sous-unité $\alpha 7B$ dans les cellules Caco-2/15 sh $\alpha 7B$.

Dans le but d'investiguer d'avantage l'implication de l'intégrine $\alpha 7\beta 1$ dans la différenciation des cellules intestinales, nous avons analysé l'impact de la restauration de l'expression de la sous-unité $\alpha 7B$ dans les cellules Caco-2/15 sh $\alpha 7B$. Des constructions plasmidiques contenant soit le cDNA3 vide ou contenant la séquence correspondant au variant extracellulaire X2 de la sous-unité $\alpha 7B$ de souris, ont été respectivement transfectées dans les cellules shCTL et les cellules sh $\alpha 7B$. Les cDNA nous ont été généreusement fournis par l'équipe du Dr Van Der Mark. L'utilisation de ces cDNA a permis précédemment de ré-

exprimer la sous-unité $\alpha 7B$ dans les cellules de muscle squelettique et cardiaque (Echtermeyer et al., 1996). L'expression de ces mêmes cDNA dans nos cellules Caco-2/15 sh $\alpha 7B$ a été réalisée avec succès et les lignées résultantes Caco-2/15 sh $\alpha 7X2B$ (2) et (3) ré-expriment de manière stable la sous-unité d'intégrine $\alpha 7B$ de souris (Figure 19A, 19C, 19E et 19F). L'analyse par immunobuvardage des extraits protéiques des cellules sh $\alpha 7X2B$ (2) et (3) montre une perte quasi-totale de l'expression de la SI (Figure 19A et 19B) corrélant avec une augmentation significative des niveaux d'expression de la sous-unité $\alpha 7B$ (Figure 19A et 19C) et ce, comparativement aux cellules CTL (shCTL(cDNA3 vide) et aux cellules sh $\alpha 7B$. De plus, une baisse conséquente des niveaux d'expression de la villine, un marqueur de maturité de la bordure en brosse, et des deux facteurs de transcription CDX-2 et HNF-1 α parallèle à la ré-expression de l'intégrine $\alpha 7\beta 1$ dans les cellules Caco-2/15 sh $\alpha 7B$ (Figure 19A).

L'investigation des modulations morphologiques par des essais en immunofluorescence indirect, a permis de confirmer la ré-expression de la sous-unité $\alpha 7B$ de souris dans les cellules sh $\alpha 7B$ (Figure 19E et 19F). Le marquage de la SI est associé à un profil d'expression propre aux cellules Caco-2/15 natifs de 3jpc, soit une expression apicale avec des intensités variables, dispersées au sein de la monocouche cellulaire (Figure 19H et 19I) et ce, de manière comparable aux cellules CTL (Figure 19G). En outre, les composantes des complexes de jonctions, soit ZO-1 et l'E-cadhérine, sont associées à une distribution homogène et à la périphérie de la cellule dans les monocouches de cellules sh $\alpha 7X2B$ (2) et (3) et des cellules CTL (Figure 19J- 19O). De surcroît, les membranes des cellules sh $\alpha 7X2B$ (2) et (3) sont régulières et structurées (Figure 19K, 19N, 19L et 19O) de manière homologue aux cellules CTL (Figure 19J et 19M).

Ces résultats mettent en évidence le lien direct entre le statut d'expression de l'intégrine $\alpha 7\beta 1$ et les changements cellulaires observés et confirment l'hypothèse d'un rôle clé de cette intégrine dans le processus de la différenciation entérocytaire.

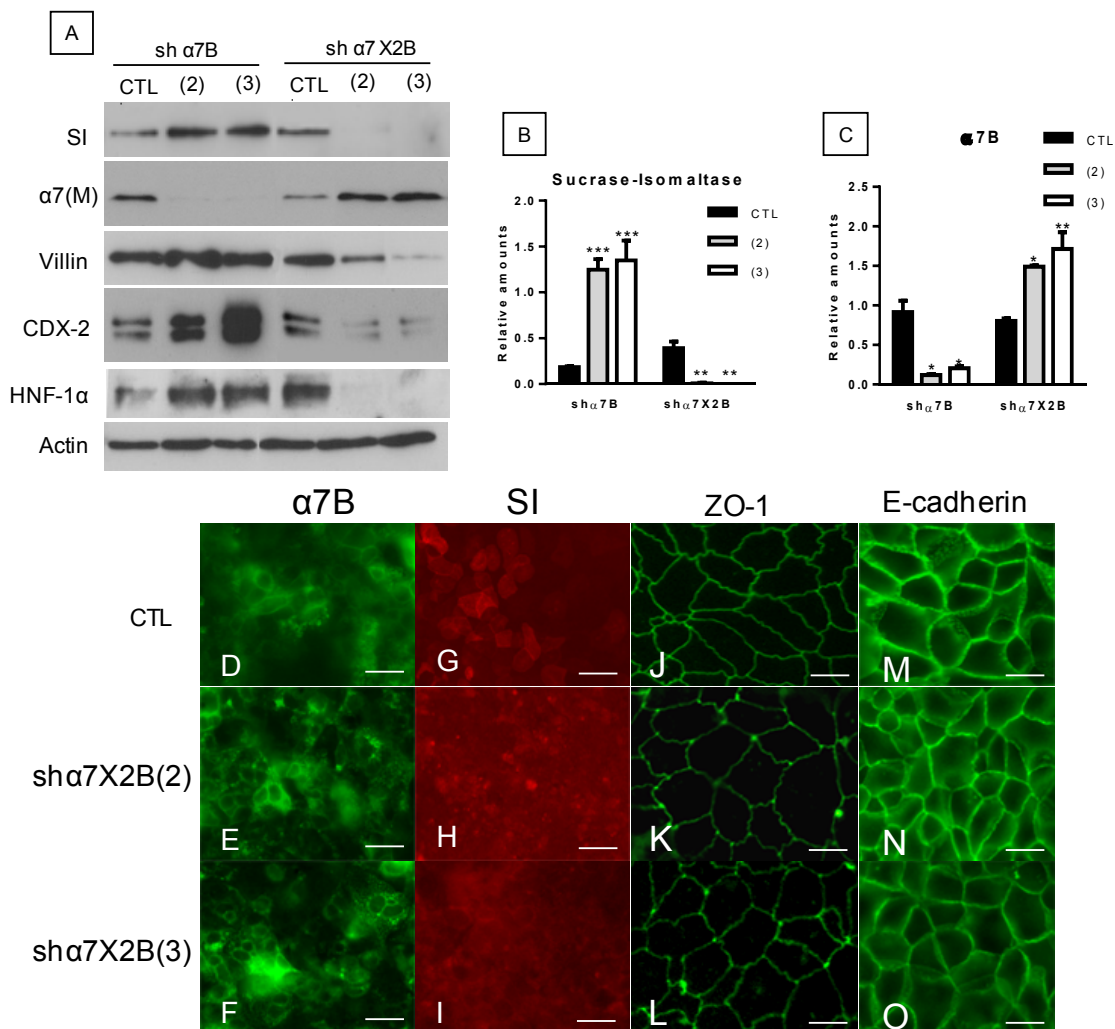


Figure 19: Caractérisation des cellules Caco-2/15 shα7X2B.

(A) Représentation d'une analyse comparative par immunobuvardage de type western blot d'extraits de protéines totales, issus respectivement de lysat de cellules Caco-2/15 shα7B (CTL, (2) et (3)) et shα7X2B (CTL, (2) et (3)) récoltées à 3 jpc, analysés pour l'expression de la SI, la sous-unité α7B (α7(M)), la villine, CDX-2 et HNF-1α. L'expression de l'actine a été analysée comme contrôle de normalisation. **(B)** Estimation des quantités relatives de la SI et **(C)** de la sous-unité α7B par analyses densitométriques des niveaux d'expression observés en immunobuvardage. Les résultats représentent la moyenne ± SE, résultant de trois expériences indépendantes. Les astérisques représentent les différences statistiques significatives, *:p≤0,05, **:p≤0,01, ***:p≤0,001. Micrographies représentatives des cellules fixées à 3jpc, obtenues par immunofluorescence indirect, comparant les cellules CTL (**D, G, J et M**) aux cellules Caco-2/15 shα7X2B(2) (**E, H, K et N**) et X2B(3) (**F, I, L et O**). Les cellules ont été incubées avec différents anticorps spécifiques pour la détection de: (**D, E et F**) la sous-unité α7B, (**G, H et I**) la SI, (**J, K et L**) ZO-1 et (**M, N et O**) la E-cadherine, (Barres= 25 μm).

3.7 Étude de la croissance des cellules Caco-2/15 sh α 7X2B.

Dans notre étude, nous avons observé que l'hyperdifférenciation des cellules Caco-2/15 à la suite de la perte de la fonctionnalité de l'intégrine α 7B β 1 n'affecte pas leurs proliférations cellulaires (Figure 17). Cependant, tel que démontré jusqu'alors l'expression forcée de la sous-unité α 7B dans les cellules sh α 7B a résultée en une régression du phénotype différencié des cellules (Figure 19). En effet, nos résultats démontrent que les cellules Caco-2/15 sh α 7X2B ré-adoptent un cheminement du programme de différenciation semblable à celui des cellules natives (Figure 19).

Dans le but d'étudier les conséquences de l'expression forcée de la sous-unité α 7B sur la prolifération des cellules sh α 7B, nous avons suivi leur croissance cellulaire sur 7 jours de culture. Tel que représenté dans la Figure 20, la réintroduction de la sous-unité α 7B n'affecte pas la croissance des cellules sh α 7B. En effet, les courbes représentatives de la croissance des cellules sh α 7X2B (2) et (3), lorsque comparées aux cellules CTL, ne relatent pas un effet significatif associé à l'expression de la sous-unité α 7B (Figure 20).

Ces résultats confirment que l'intégrine α 7 β 1 ne joue pas de rôle dans la prolifération cellulaire intestinale et que sa fonction est exclusivement reliée à la différenciation entérocytaire.

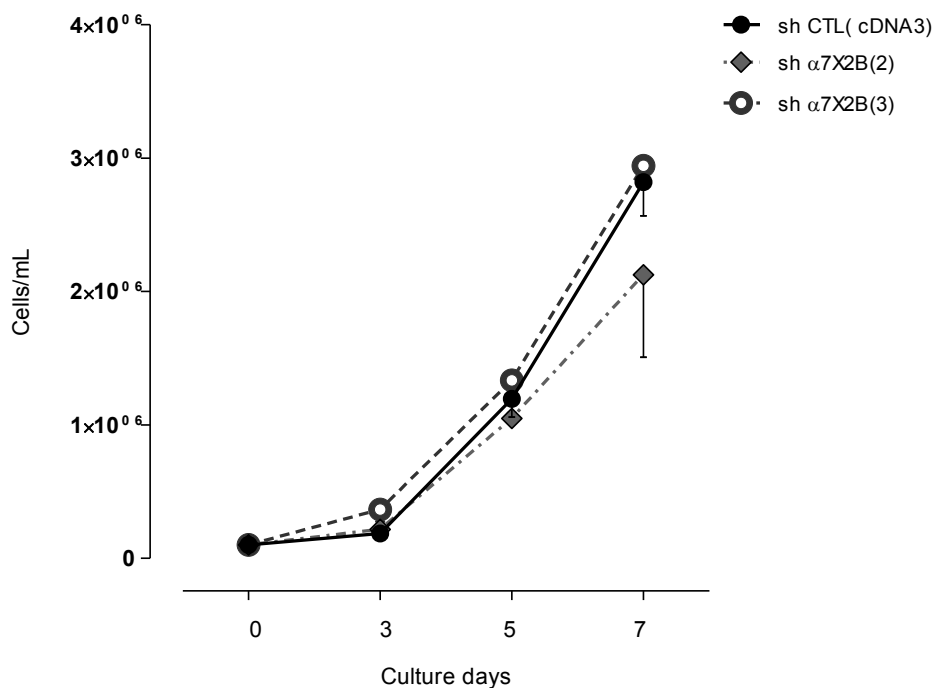


Figure 20: La réexpression de la sous-unité $\alpha 7X2B$ dans les cellules Caco-2/15 sh $\alpha 7B$ n'affecte pas la croissance cellulaire.

Une représentation des courbes de prolifération des cellules Caco-2/15 shCTL (cDNA3), en comparaison aux cellules sh $\alpha 7X2B(2)$ et (3) et illustrant le nombre de cellules/ml dénombrées à différents temps de culture 3, 5 et 7 jours post ensemencement. Les comptages des cellules représentent la moyenne \pm SE, résultant de trois expériences indépendantes.

3.8 La voie LKB1 est activée dans les cellules Caco-2/15 sh α 7B.

La voie LKB1 a été largement étudiée pour son implication dans le contrôle de diverses fonctions cellulaires incluant : l'arrêt du cycle cellulaire (Tiainen et al., 2002), l'apoptose (Karuman et al., 2001), la signalisation (Ossipova et al., 2003; Spicer et al., 2003) et le métabolisme énergétique (Hawley et al., 2003; Woods et al., 2003). Récemment, LKB1 a été aussi décrite comme ayant un rôle clé dans l'établissement de la polarisation cellulaire (Baas et al., 2004; Partanen et al., 2012). Pour ce dernier rôle, elle serait responsable du maintien de la stabilité des jonctions intercellulaires et de la régulation de l'expression de la E-cadhérine, une composante majeure des jonctions adhérentes des cellules épithéliales intestinales (Eneling et al., 2012; Roy et al., 2010).

L'analyse par RT-PCR de l'expression de l'ARNm de LKB1 dans les cellules Caco-2/15, montre une corrélation positive avec la confluence cellulaire (Figure 21A). Ces résultats suggèrent une activation de cette voie au cours de la différenciation des cellules et montrent que le pic d'expression maximal de LKB1 se situe entre 10- 15 jours de confluence (Figure 21A). Cet intervalle de temps est déterminant pour l'organisation de la bordure en brosse et la mise en place des jonctions intercellulaires des cellules Caco-2/15 en culture. Tel qu'illustré dans la Figure 21B et 21C, une augmentation significative des niveaux d'expression de LKB1 est observée dans les cellules sh α 7B(2) et (3), comparativement aux cellules CTL de même stade de confluence tant pour le niveau de l'ARNm (Figure 21B) que celui de la protéine (Figure 21C).

Ces résultats suggèrent une suractivation de la voie de signalisation LKB1 dans les cellules déficientes en α 7B qui affichent des niveaux très élevés de la SI et qui se distinguent par une polarisation précoce.

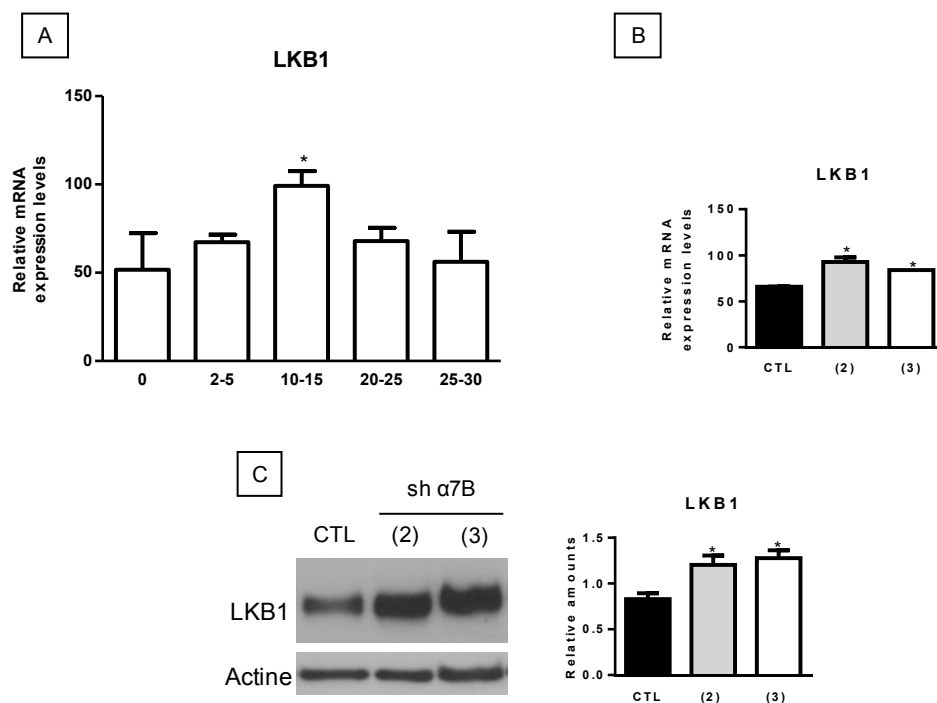


Figure 21: La voie LKB1 est activée dans les cellules Caco-2/15 sh $\alpha 7B$.

(A) Estimation des quantités relatives des niveaux du transcrit de LKB1 dans les cellules Caco-2/15 durant la différenciation entérocytaire et **(B)** dans les cellules Caco-2/15 sh $\alpha 7B$ (2) et (3) comparativement au shCTL par analyses densitométriques des niveaux d'expression observés par RT-PCR. Les quantités de LKB1 ont été relativisées par rapport au contrôle RPLPO. **(C)** Représentation d'une analyse par immunobuvardage de type western d'extraits protéiques issus de lysats de cellules Caco-2/15 sh $\alpha 7B$ (2) et (3) récoltés à 3 jpc et analysés pour l'expression de LKB1 comparativement aux cellules shCTL du même stade de confluence. L'expression de l'actine a été analysée comme contrôle de normalisation. Les histogrammes montrent les estimations des quantités relatives de LKB1 par une analyse densitométrique des niveaux d'expression observés en immunobuvardage. Les astérisques représentent les différences statistiques significatives, *: $p \leq 0,05$,

3.9 La kinase Src est activée durant la différenciation entérocytaire.

La lignée cellulaire Caco-2/15 a été largement exploitée pour son habilité à exécuter spontanément en culture un programme de différenciation entérocytaire dès l'atteinte de la confluence (Chantret et al., 1988; Czernichow et al., 1989). Cette aptitude se reflète par leur expression robuste de plusieurs marqueurs de la différenciation entérocytaire (Sambuy et al., 2005), notamment la SI.

Tel que montré dans la Figure 22A, l'expression de la SI augmente avec la confluence des cellules Caco-2/15. D'autre part, l'analyse des niveaux d'expression de l'ARNm de la kinase Src dans les cellules Caco-2/15 en culture à différents stades de confluence révèle que les niveaux de transcrite de Src augmentent significativement dès 0 jpc pour se poursuivre jusqu'à 15 jpc (Figure 22B). Ces résultats suggèrent une corrélation dans l'expression de la SI et de la kinase Src dans les cellules Caco-2/15.

Afin d'évaluer le statut d'activation de Src, une mesure du niveau d'autophosphorylation de la Tyr 416 de Src dans les cellules Caco-2/15 a été effectuée en fonction des stades de confluence. L'analyse par immunobuvardage de type western révèle des niveaux de phosphorylation significatifs de la Tyr 416 dès l'atteinte de la confluence dont le maximum est observé à 3 jpc (Figure 22C et 22E). De plus, l'analyse des extraits protéiques des cellules Caco-2/15 montre une corrélation entre le début de l'expression de la SI le pic d'activité de la kinase Src (Figure 22D et 22E). Ces résultats suggèrent une corrélation fonctionnelle entre l'activation de la kinase Src et la différenciation entérocytaire.

Dans l'étude de Basora. et al, les auteurs avaient montré que l'intégrine $\alpha 7\text{B}\beta 1$ s'associe à un pic d'expression dans les cellules Caco-2/15 à 3jpc et corrélant avec le début d'expression de la SI. Cette étude associée à nos résultats nous permettent de suggérer l'hypothèse d'une association fonctionnelle entre l'expression de l'intégrine $\alpha 7\text{B}\beta 1$, l'activation de la kinase Src et la différenciation entérocytaire.

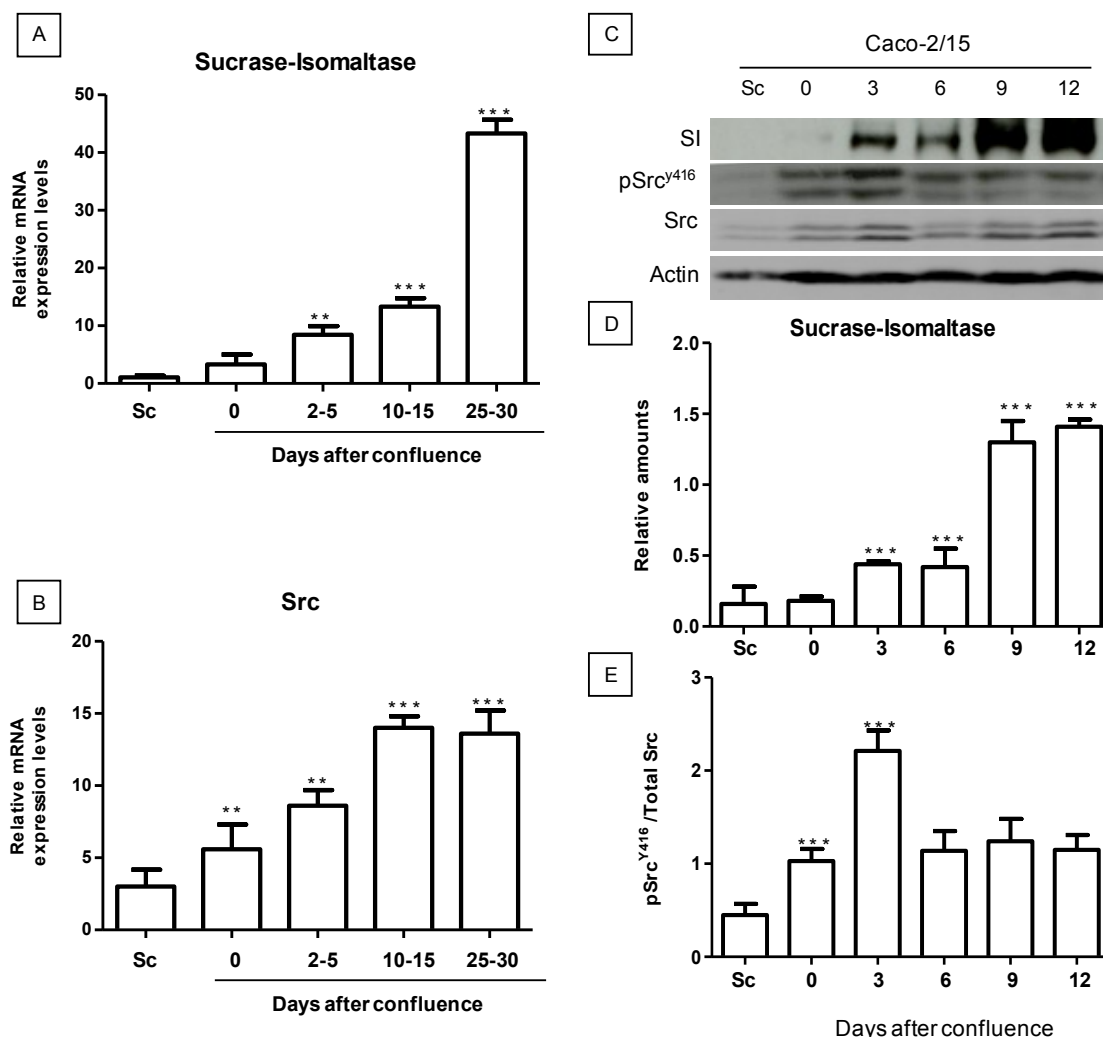


Figure 22: L'expression de la kinase Src (pSrc Y416) durant la différenciation des cellules Caco-2/15.

(A – B) Des analyses de PCR quantitatif illustrent les niveaux d'expression des ARNm de la SI (A) et de Src (B) dans les cellules Caco-2/15 selon les stades de confluence. (C) Représentation d'une analyse par immunobuvardage de type western d'extrait de protéine totale issu de lysat de cellules Caco-2/15 natives à différents stades de confluence : Sc , 0, 3, 6, 9 et 12 jpc, montrant les niveaux d'expression de la SI, la pSrc y416 et de Src totale. L'expression de l'actine a été analysée comme contrôle de normalisation. Estimation des quantités relatives de SI (D) et de pSrcY416/Src totale (E) par analyses densitométriques des niveaux d'expression observés en immunobuvardage. Les résultats représentent la moyenne \pm SE, résultant de trois expériences indépendantes. Les astérisques représentent les différences statistiques significatives, *:p \leq 0,05, **:p \leq 0,01, ***: p \leq 0,001. Les différences des quantités relatives de pSrcY416/Src totale entre les jours 3 vs Sc et 6 post confluence sont statistiquement significatives.

3.10 L'activité de la kinase Src est sous-réglée dans les cellules Caco-2/15 sh α 7B.

Après l'atteinte de la confluence les cellules Caco-2/15 amorcent un programme de différenciation sur une période totale de 15-20 jpc. Par contre, pendant les 15 premiers jours de culture, la monocouche cellulaire est hétérogène et fournit une fenêtre temporelle dans laquelle il est facile de distinguer les voies de signalisations intracellulaires impliquées dans les événements de prolifération et de différenciation (Beaulieu and Quaroni, 1991; Vachon and Beaulieu, 1992).

Dans le but d'étudier le rôle de Src dans la différenciation cellulaire épithéliale intestinale α 7B dépendante, nous avons évalué l'activité de Src en mesurant la phosphorylation de la Tyr 416, qui témoigne de l'activité de la kinase Src dans les cellules Caco-2/15 sh α 7B. Nos résultats montrent que l'activité de Src est significativement diminuée dans les cellules sh α 7B (2) et (3), en comparaison aux cellules Caco-2/15 shCTL et natives (Figure 23A). Des analyses par PCR quantitatif de l'expression des ARNm de la sous unité α 7B et de la SI montrent que l'inhibition de la sous-unité α 7B dans les cellules sh α 7B (2) et (3) corrèle avec une augmentation significative de l'expression de la SI (Figure 23B). Des analyses par PCR quantitatif illustrent les modulations des niveaux d'expression des ARNm des membres de la famille de la kinase Src : Src (Figure 23C), Fyn (Figure 23D) et Lyn (Figure 23E) dans les cellules Caco-2/15 sh α 7B(2), (3) et les cellules Caco-2/15 shCTL. La baisse d'expression de la sous-unité α 7B agit différemment sur les membres de la famille de la kinase Src. En effet, seuls les transcrits de Src et Fyn sont diminués significativement, tandis que ceux de Lyn restent inchangés (Figure 23C- 23E).

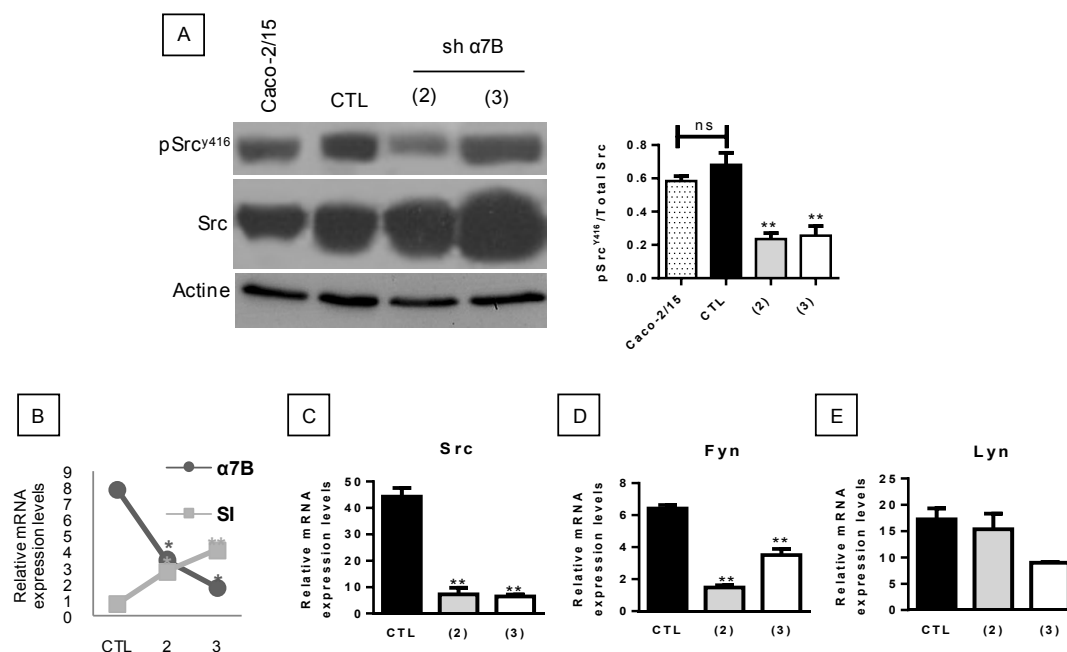


Figure 23: Effet de l'inhibition de l'intégrine $\alpha 7\beta 1$ sur l'activation des kinases Src dans les cellules Caco-2/15.

(A) Représentation d'une analyse par immunobuvardage de type western d'extraits protéiques, issus de lysats de cellules Caco-2/15 sh $\alpha 7\beta 1$ (2) et (3), à (3) jpc analysés pour l'expression de la pSrc y416 et de Src totale, comparativement aux cellules CTL et aux cellules Caco-2/15 natives au même stade de confluence. L'expression de l'actine a été analysée comme contrôle de normalisation. Une estimation des quantités relatives de pSrcY416/Src totale par une analyse densitométrique des niveaux d'expression observés en immunobuvardage est illustrée sous forme d'histogramme en **(A)**. **(B – E)** Des analyses par PCR quantitatif illustrent les différences d'expression des messagers de la sous-unité $\alpha 7\beta 1$ **(B)**, de la sucrase-isomaltase **(B)**, de Src **(C)**, de Fyn **(D)** et de Lyn **(E)** dans les cellules Caco-2/15 sh $\alpha 7\beta 1$ (2) et (3) comparativement aux cellules Caco-2/15 sh CTL. Les résultats représentent la moyenne \pm SE, résultant de trois expériences indépendantes. Les astérisques représentent les différences statistiques significatives, *: $p \leq 0,05$, **: $p \leq 0,01$, ***: $p \leq 0,001$.

3.11 L'inhibition de l'expression de l'intégrine $\alpha 7 \beta 1$ corrèle avec une baisse d'activité du complexe de répression polycombs PRC2.

Récemment, il a été montré que la modulation épigénétique via le complexe polycomb PRC2, un complexe responsable de la triméthylation de la lysine 27 sur l'histone 3 (H3K27me3) qui réprime l'expression génique, est impliquée dans la régulation de la différenciation entérocytaire (Benoit et al., 2012b). Les auteurs ont constaté que SUZ12, membre du complexe PRC2, réprime l'expression de marqueurs de différenciation terminale lors des premières étapes de différenciation entérocytaire, notamment la SI. Cependant, aucun changement n'a été observé dans les caractéristiques de polarisation ni dans l'expression des facteurs de transcription CDX-2 et HNF-1 α (Benoit et al., 2012b).

Afin de déterminer si la voie du complexe PRC2 est affectée par l'inhibition de l'intégrine $\alpha 7 \beta 1$, les cellules Caco-2/15 sh $\alpha 7 \beta 1$ ont été analysées pour l'expression de H3K27me3. L'analyse par immunobuvardage de type western montre une diminution significative des niveaux d'expression de H3K27me3 (Figure 24A et 24B) qui sont inversement proportionnels à ceux de la SI (Figure 24A) dans les cellules Caco-2/15 sh $\alpha 7 \beta 1$.

Ces résultats donnent un aperçu de l'étendue et de l'importance de la régulation associée à l'intégrine $\alpha 7 \beta 1$ dans l'épithélium intestinal. En effet, l'ensemble de nos observations témoigne de l'authenticité du programme de différenciation entérocytaire exécuté par les cellules Caco-2/15 sh $\alpha 7 \beta 1$. Avec la perte d'expression de l'intégrine $\alpha 7 \beta 1$, ce programme est exécuté dans un délai dix fois plus court que pour les cellules Caco-2/15 natives, cependant, il obéit à tous les mécanismes de régulation associés à la différenciation entérocytaire conventionnelle.

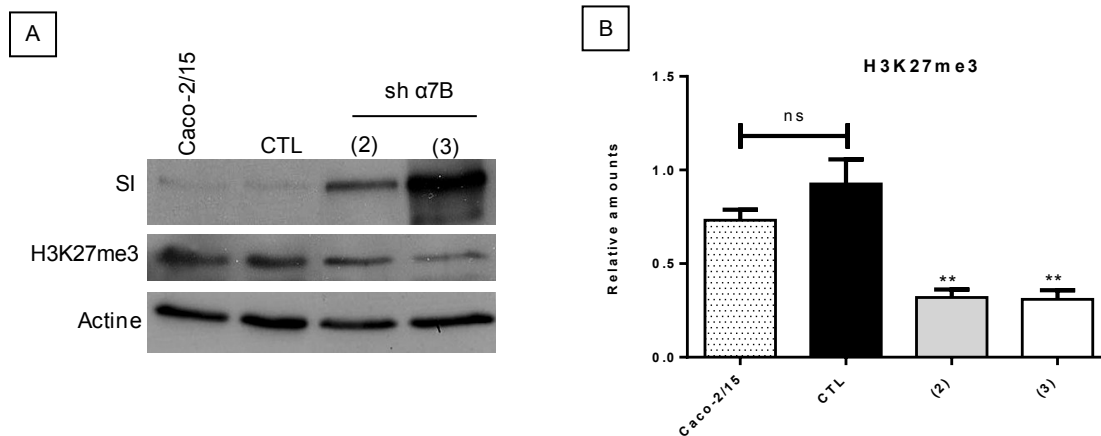


Figure 24: L'expression de PRC2 associée à la marque épigénétique (H3K27me3) dans cellules Caco2/15 sh $\alpha 7B$.

(A) Représentation d'une analyse par immunobuvardage de type western des extraits protéiques issus de lysat de cellules Caco-2/15 sh $\alpha 7B$ (2) et (3), à (3) jpc analysés pour l'expression de la SI et H3K27me3 et ce, comparativement aux cellules CTL et aux cellules Caco-2/15 natives au même stade de confluence. L'expression de l'actine a été analysée comme contrôle de normalisation. **(B)** Une estimation des quantités relatives de H3K27me3 par une analyse densitométrique des niveaux d'expression observés en immunobuvardage. Les résultats représentent la moyenne \pm SE, résultant de trois expériences indépendantes. Les astérisques représentent les différences statistiques significatives, **: $p \leq 0,01$.

Discussion

Dans la section précédente, j'ai présenté notre étude sur l'impact de la perte de l'expression de l'intégrine $\alpha 7 \beta 1$ sur la différenciation des cellules épithéliales intestinales humaines. J'ai abordé sa régulation dans le processus de différenciation morphologique et biochimique, ainsi que son impact sur l'expression des effecteurs de signalisation « Src et LKB1 » et du complexe polycomb PRC2. Dans la présente section je discuterai des résultats clés en se basant sur nos observations et sur les données de la littérature, et je terminerai en proposant des mécanismes de régulations possiblement liés à l'intégrine $\alpha 7 \beta 1$ dans le tissu épithélial intestinal.

4.1 L'impact d'une inhibition de l'intégrine $\alpha 7 \beta 1$ sur la biologie des cellules épithéliales intestinales

L'intégrine $\alpha 7 \beta 1$ est le récepteur majeur à laminine des cellules du muscle squelettique, cardiaque et lisse (Burkin and Kaufman, 1999; von der Mark et al., 1991). L'expression, les fonctionnalités de la sous-unité d'intégrine $\alpha 7$, ainsi que les mécanismes qui gouvernent son activité, ont fait l'objet d'un grand intérêt au cours de la dernière décennie. L'importance physiologique de l'intégrine $\alpha 7 \beta 1$ fut révélée lors d'études portant sur le muscle squelettique. En effet, chez la souris l'inactivation du gène *Itga7* codant pour la sous-unité $\alpha 7$ provoque des séquelles très graves. Les souris déficientes en $\alpha 7$ souffrent d'une nouvelle forme progressive de dystrophie musculaire, associée à une rupture des jonctions myotendineuses (Martin et al., 1996) et d'une défaillance de la régénération axonale (Werner et al., 2000). Toutefois, le rôle de l'intégrine $\alpha 7 \beta 1$ dans la régulation des fonctions intestinales demeure méconnu jusqu'à présent. Basora et al, avaient démontré que l'épithélium intestinal ainsi que les cellules Caco-2/15 expriment spécifiquement la sous-unité $\alpha 7 \beta$ (Basora et al., 1997). Dans l'intestin

humain, l'expression de l'intégrine $\alpha 7\beta 1$ est régulée au cours du développement et se retrouve à être limitée à la jonction crypte-villosité à l'âge adulte. D'autre part, l'étude de l'expression de l'intégrine $\alpha 7\beta 1$ dans des modèles cellulaires épithéliaux intestinaux démontre une sur-expression ponctuelle de la sous-unité $\alpha 7\beta$ dans les cellules Caco-2/15. Ce pic d'expression corrèle particulièrement avec l'initiation de la différenciation entérocytaire. L'ensemble de ces observations avait permis aux auteurs de suggérer la possibilité d'un feed-back positif entre l'expression de l'intégrine $\alpha 7\beta 1$ et la différenciation entérocytaire intestinale (Basora et al., 1997).

Toutefois, l'inactivation de l'intégrine $\alpha 7\beta 1$, par le biais d'infections lentivirales, suggère qu'elle serait plutôt un répresseur de la différenciation des cellules épithéliales intestinales. En effet, l'inhibition de l'expression de la sous-unité $\alpha 7\beta$ dans les cellules Caco-2/15 conduit à l'expression de niveaux particulièrement élevés des marqueurs globaux de la différenciation, en particulier ceux de la SI. Nous avons estimé les niveaux d'expression du transcrit et de la protéine de la SI à environ 4 fois supérieurs à la condition normale et ce, dès l'atteinte de la confluence.

Il est pertinent de noter que lors de nos investigations en microscopie par immunofluorescence indirecte, nous avons observé un marquage positif de la SI dans les cellules Caco-2/15 sh $\alpha 7\beta$ même à sous confluence (Résultats non publiés). Ces observations suggèrent une régulation particulière de l'expression de la SI dans notre modèle cellulaire. En effet, il est connu que l'expression de la SI, débute et augmente graduellement avec la confluence des cellules épithéliales intestinales en culture, pour atteindre son maximum d'expression vers le 30^{ème} jpc (Beaulieu and Quaroni, 1991; Vachon and Beaulieu, 1992; Vachon et al., 1996b). Néanmoins, l'étude des mécanismes qui régulent l'expression de la SI dans les cellules épithéliales intestinales a déterminé que plusieurs facteurs peuvent l'influencer, notamment, des facteurs génétiques, environnementaux et physiologiques (Semenza, 1986). En outre, ces mécanismes ont été associés à différents niveaux de régulation intracellulaire, qui peuvent être soit au niveau transcriptionnel, traductionnel ou bien post-traductionnel (Beaulieu et al., 1989;

Keller et al., 1992; Traber, 1990). Ces données viennent appuyer la présence d'une régulation potentiellement différente de l'expression de la SI dans les cellules Caco-2/15 sh α 7B. D'où l'importance de déterminer les facteurs et les voies de signalisation intracellulaires qui peuvent être impliqués dans ces régulations.

Récemment, le complexe polycomb PRC2 a été associé à un rôle répressif sur le programme de différenciation entérocytaire (Benoit et al., 2012b). En effet, le complexe polycomb répresseur de type-2 ou PRC2 est reconnu comme étant l'initiateur de la répression épigénétique (Sparmann and van Lohuizen, 2006). Ce complexe est formé de trois protéines centrales : EED, EZH2 et SUZ12. La protéine SUZ12 est décrite comme étant un pivot pour l'assemblage et pour la fonctionnalité du complexe PRC2 (Cao and Zhang, 2004). Cette dernière peut occuper et réprimer la transactivation des promoteurs de divers gènes codants pour des facteurs de transcriptions favorables à la différenciation et aussi des gènes codants pour des régulateurs du développement (Lee et al., 2006). L'action du complexe polycomb sur le programme de différenciation entérocytaire a été en partie démontrée par la modulation dépendante de SUZ12 des niveaux d'expression de la SI dans les cellules Caco-2/15 (Benoit et al., 2012b). Dans notre étude, ce mécanisme de régulation épigénétique est aussi fortement modulé. En effet, l'inactivation de la sous-unité α 7B dans les cellules Caco-2/15 a conduit à une baisse notable de la tri-méthylation de la lysine 27 de l'histone H3 (H3K27me3), une marque épigénétique connue comme étant la signature moléculaire de l'activité des complexes répresseurs polycomb. Cependant, à la différence de ce qui a été rapporté pour SUZ12 (Benoit et al., 2012b), la baisse d'activité du complexe polycomb ne s'associe pas à un arrêt de la prolifération des cellules sh α 7B. Ce résultat témoigne de l'importance et de la complexité des événements associés au rôle de l'intégrine α 7B β 1 dans le contrôle de la différenciation entérocytaire.

En considérant l'ensemble des résultats représentant les niveaux d'expression de la SI dans les cellules Caco-2/15 sh α 7B, on pourrait envisager la présence d'une régulation transcriptionnelle de cette dernière. Pareillement,

l'habilité des cellules sh α 7B sous confluent à exprimer la SI, ainsi que l'augmentation drastique de ses niveaux d'expression dès l'atteinte de la confluence, portent à croire à une expression constitutive du gène de la SI. De même, il est important de noter que cette expression active de la SI dans nos cellules semble être très peu affectée par la croissance ou l'état de la confluence cellulaire. Cette hypothèse est aussi appuyée par nos résultats relatifs à l'expression de différents facteurs de transcription associés au programme de la différenciation entérocytaire. En effet, nous avons montré que les cellules sh α 7B affichent une augmentation significative des niveaux d'expression des facteurs de transcriptions CDX-2 et HNF-1 α . L'action concertée de ces derniers est décrite comme étant requise pour l'expression des marqueurs fonctionnels de la différenciation intestinale, notamment la SI (Benoit et al., 2010; Boudreau et al., 2002).

Néanmoins, l'augmentation drastique des niveaux d'expressions protéiques de la SI dans les cellules sh α 7B ne peut être seulement attribuée à une régulation soutenue de la transcription de cette dernière. Cette affirmation est argumentée par différentes observations décrites dans la littérature. En effet, une analyse comparative des différents clones des cellules Caco-2 a permis de montrer qu'il existe des écarts dans leur degré d'expression de la SI ainsi que dans les mesures de l'activité de cette dernière. Ceci a permis de suggérer que la SI est sujet à une régulation transcriptionnelle majorée par des modifications post-traductionnelles dans les cellules Caco-2. Dans ce même ordre d'idée, plusieurs études ont aussi fait la démonstration de la présence de différentes formes de la SI au sein du le tissu intestinal, notamment, dans les cellules de la crypte intestinale (Beaulieu et al., 1989) et dans le colon humain (Beaulieu et al., 1990). Ces différentes formes de la SI divergent dans les conformations finales qu'elles adoptent. Cette différence résulterait probablement d'un défaut de maturation au cours de la synthèse protéique pendant l'étape de conversion entre les précurseurs de la SI, les *high mannose precursor 1 et 2*, (Beaulieu and Quaroni, 1991). En tenant compte de ces données, il n'est pas exclu que nos cellules Caco-2/15 sh α 7B puissent exprimer une forme distincte de la SI. Cette forme

particulière présenterait une conformation et une activité enzymatique plus efficaces pour l'acquisition de la différenciation entérocytaire. D'un autre côté, cette hypothèse est corroborée par certaines données de la littérature qui décrivent l'étape de conversion entre les précurseurs de SI comme étant fortement modulée sous l'influence de divers facteurs physiologiques, notamment les facteurs de la croissance cellulaire (Cross and Quaroni, 1991; Quaroni et al., 1993). Nos observations corrélerent la perte de l'intégrine $\alpha 7B\beta 1$ dans les cellules caco-2/15 avec des changements physiologiques majeures, notamment une plus grande maturation des cellules, ce qui permet de considérer une telle régulation dans notre contexte d'étude. Ce faisant afin de vérifier ces hypothèses il serait pertinent de comparer l'activité transcriptionnelle ainsi que la biosynthèse de la SI dans les cellules Caco-2/15 sh $\alpha 7B$ et les cellules natives.

Certes, bien que la surexpression de la SI observée dans les cellules sh $\alpha 7B$ soit spectaculaire, il est toutefois important de noter que nos résultats montrent que la DPPIV et la villine, d'autres marqueurs de la bordure en brosse, sont aussi significativement augmentés dans les cellules Caco-2/15 sh $\alpha 7B$. De ce fait, il semble évident que les changements intracellulaires médiés par l'intégrine $\alpha 7\beta 1$ englobent des facteurs et des mécanismes de régulation qui sont importants dans le processus général de la différenciation des cellules épithéliales intestinales. Notre caractérisation des cellules sh $\alpha 7B$ témoigne d'une accélération du programme de différenciation biochimique des cellules intestinales. De plus, il est intéressant de noter qu'au cœur même de ce modèle le concept de la prolifération et de la différenciation cellulaire semble être des processus indépendants.

L'hétérogénéité phénotypique des cellules Caco-2/15 en culture, a été soulignée dans de nombreuses études (Beaulieu and Quaroni, 1991; Hauri et al., 1985; Seltana et al., 2011). Cet événement est souvent interprété comme l'équivalent *in-vitro* du patron de la différenciation en mosaïque associé à certaines régions du tractus gastro-intestinal (Semenza et al. 1993; Semenza et al. 1995)(Nichols et al., 1997). Notre caractérisation des cellules Caco-2/15 sh $\alpha 7B$ semble les prévaloir d'un statut physiologique distinct des entérocytes humains.

Vachon et Beaulieu, avaient décrits une chronologie d'états cellulaires par lesquels les cellules Caco-2 en culture arrivent à leur maturation fonctionnelle terminale (Vachon and Beaulieu, 1992). Ainsi, trois stades successifs avaient été proposés et ce, par égard à l'uniformité et le degré de la différenciation des cellules au sein de la monocouche en culture : indifférenciées, une polarisation/différenciation hétérogène et une polarisation/différenciation homogène. Par conséquent, selon cette classification les cellules sh α 7B feraient partie du troisième stade dès 3 jours de culture à post-confluence, puisque l'on note la présence de jonctions intercellulaires matures, d'une bordure en brosse bien développée, des niveaux d'expression très élevés de la SI et d'une grande uniformité de la monocouche cellulaire, témoignant d'un stade terminal de la différenciation entérocytaire. L'ensemble de nos résultats permet d'affirmer que le modèle cellulaire Caco-2/15 sh α 7B exhibe des traits distinctifs qui contestent le modèle actuel de la différenciation des cellules épithéliales intestinales. En effet, avec la perte de la pression régulatrice de l'intégrine α 7B β 1, les cellules Caco-2/15 forment une monocouche confluyente assujettie à des changements physiologiques comparables à ceux requis pour l'accomplissement de la différenciation cellulaire terminale dans la région supérieure des cryptes.

L'inhibition de l'intégrine α 7B β 1 a permis de révéler son impact sur le phénotype des cellules épithéliales intestinales. À priori la présence de l'intégrine α 7B β 1 semble suffisante pour freiner efficacement l'acquisition de la différenciation biochimique et morphologique des entérocytes. Cette hypothèse est d'autant plus appuyée par les essais d'expression forcée de la sous-unité α 7B dans les cellules Caco-2/15 sh α 7B. En effet, la réintroduction de la sous-unité α 7B dans les cellules sh α 7B permet de rétablir un processus de différenciation normal. De plus, l'importance des événements associés à la perte de l'intégrine α 7B β 1, qui compte l'ensemble des mécanismes de régulation et des critères de la différenciation entérocytaire terminale, lui suggère une large incidence sur différents effecteurs intracellulaires. En effet, il est connu que l'intégrine α 7 β 1 peut participer à la transmission de signaux émis de part et d'autre de la membrane cellulaire associés à un remodelage phénotypique des cellules musculaires (Baas

et al., 2004; Boppart et al., 2006). Par contre, dans le tissu intestinal le mode d'action de l'intégrine $\alpha 7\beta 1$ ainsi que les facteurs touchés par son statut demeurent une question non résolue. Dans les deux prochaines parties je discuterai, d'une part, l'importance et les possibilités d'interactions de l'intégrine $\alpha 7\beta 1$ avec la membrane basilaire au niveau de l'unité fonctionnelle intestinale et, d'autre part, l'implication possible de l'intégrine $\alpha 7\beta 1$ dans la modulation des effecteurs et des voies de signalisations intracellulaires.

4.2 Interactions de l'intégrine $\alpha 7\beta 1$ avec la membrane basilaire intestinale

4.2.1 Interaction de l'intégrine $\alpha 7\beta 1$ avec les laminines

Le contrôle du comportement cellulaire est crucial au cours du développement mais également lors des remaniements tissulaires physiologiques (Boppart et al., 2006; Dufour et al., 2004; Gagne et al., 2010) et pathologiques (Blikslager et al., 2007; Blumberg et al., 2008)(Seltana, A et al.2011). Les interactions entre les cellules et les molécules matricielles jouent un rôle important dans le devenir cellulaire (Basson et al., 1992a; Basson et al., 1992b; De Arcangelis et al., 1996; Seltana et al., 2010). Dans ce contexte, les intégrines fonctionnent comme des transmetteurs mécaniques pouvant transformer des forces mécaniques créées par la matrice extracellulaire ou encore le cytosquelette en signaux chimiques capables de moduler le comportement cellulaire (Belkin and Stepp, 2000; Benoit et al., 2012a). C'est le cas de l'intégrine $\alpha 7\beta 1$ qui a été spécifiquement associée à la différenciation laminine-dépendante des cellules du muscle squelettique (Kaufman et al., 1985; Kramer et al., 1991; Song et al., 1992).

Initialement identifié comme un récepteur exclusif de la laminine-1 (laminine-111 selon la nouvelle nomenclature) (von der Mark et al., 1991), l'intégrine $\alpha 7\beta 1$ a été aussi décrite pour lier efficacement les laminine-2/4 (Nishiuchi et al., 2006; Vachon et al., 1996a; Vachon et al., 1997) et ne partageant aucune affinité d'interaction avec la laminine-5 (Dans la nouvelle nomenclature elles sont désignées respectivement par laminine-211/ laminine-221 et laminine-332 tel que décrits dans le Tableau1) (Nishiuchi et al., 2006). En se basant sur la nature des

laminines décrites dans la membrane basilaire de l'épithélium intestinal, Basora et al avaient proposé que l'interaction de la laminine-1 (marquage correspondant à la laminine-10 (-511) après réévaluation par (Teller et al., 2007)) avec l'intégrine $\alpha 7\beta 1$ serait un pré-requis essentiel à la différenciation entérocytaire (Basora et al., 1997). Cependant, nos résultats actuels démontrent clairement un effet répresseur de l'intégrine $\alpha 7\beta 1$ sur le processus de différenciation. Ce qui en soit n'exclut pas une coopération entre l'intégrine $\alpha 7\beta 1$ et les éléments de la membrane basilaire comme un mécanisme de régulation des fonctions intestinales associées.

Les lames basales ont longtemps été définies comme des structures morphologiques discrètes dont la fonction était limitée au cloisonnement des compartiments tissulaires. C'est seulement au cours des quinze dernières années que de avancées significatives ont été réalisées dans la compréhension de leur composition moléculaire et leur importante fonction. Les laminines sont une famille de molécules multifonctionnelles spécifiques des lames basales et elles sont les composantes majeures de cette dernière. Ces molécules ont été démontrées pour leur rôle fondamental dans le contrôle du comportement cellulaire, tant au cours du développement que pour assurer un grand nombre de fonctions cellulaires. La famille des laminines compte aujourd'hui plus d'une douzaine de membre qui sont résumés dans le Tableau. 1.

La réévaluation récente des molécules fonctionnelles exprimées par l'épithélium a permis de recenser de nouveaux membres de la famille des laminines dans la composition de la membrane basilaire intestinale (Teller et al., 2007). Au niveau de l'épithélium intestinal, ces laminines ainsi que les intégrines sont associées à des patrons d'expression particulièrement intéressants. En effet, elles obéissent à une distribution compartimentées, tant au cours du développement de l'épithélium intestinal qu'au niveau de l'axe crypte/villosité au stade adulte (Basora et al., 1997; Beaulieu and Vachon, 1994; Lussier et al., 2000; Teller et al., 2007; Teller and Beaulieu, 2001). Parmi les laminines décrites dans la membrane basilaire intestinale, la laminine purifiée -4C7, rebaptisée laminine-511 est confinée au niveau de la villosité intestinale. Cette laminine a

particulièrement suscitée l'intérêt des recherches actuelles de part sa capacité à moduler l'expression des gènes reliés à la différenciation mais aussi pour son rôle dans l'établissement et le maintien de la différenciation fonctionnelle de la lignée Caco-2/15, représentative des cellules entérocytaires humaines (Seltana et al., 2010; Seltana et al., 2011; Simoneau et al., 1998; Teller et al., 2007; Vachon and Beaulieu, 1992; Vachon et al., 1993). Cependant, jusqu'à présent peu d'informations sont connues sur la nature de l'intégrine partenaire qui est impliquée dans la régulation dépendante de la laminine-511 dans l'intestin humain. Ceci est d'autant plus complexe puisqu' au niveau de l'unité fonctionnelle intestinale mis à part l'intégrine $\alpha 7 \beta 1$ plusieurs autres intégrines, notamment l'intégrine $\alpha 6 \beta 4$ et $\alpha 3 \beta 1$, partagent des affinités de liaison à la laminine-511 et colocalisent avec cette dernière.

En effet, l'intégrine $\alpha 6 \beta 4$ qui est associée à une expression à la base des cellules épithéliales et qui longe l'axe crypte/ villosité (Beaulieu, 1992; Dydensborg et al., 2009a; Perreault et al., 1995; Simon-Assmann et al., 1994) pourrait représenter un compétiteur de choix à l'intégrine $\alpha 7 \beta 1$. Néanmoins, la distribution marginale de l'intégrine $\alpha 6 \beta 4$ englobant au même degré les compartiments prolifératifs et différenciés, mais aussi qui se retrouve à la base des cellules endodermes intestinales au cours de la gestation, porte questionnements sur la vigueur de l'intégrine $\alpha 6 \beta 4$ à établir la différenciation des cellules intestinales. Ceci est d'autant plus vrai étant donné que plusieurs études ont montré l'existence de différentes isoformes des sous-unités $\alpha 6$ et $\beta 4$ qui peuvent se combiner différemment et de manière étroitement liée au phénotype cellulaire (Dydensborg et al., 2009a). En effet, deux formes de l'intégrine $\alpha 6 \beta 4$ ont été décrites, l'intégrine $\alpha 6 A \beta 4 \text{ctd}^-$ et l'intégrine $\alpha 6 B \beta 4 \text{ctd}^+$ qui sont respectivement exprimées par les cellules prolifératives et les cellules quiescentes/différenciées. Si la première joue un rôle de pro-prolifération et est non fonctionnelle pour l'adhésion à la laminine-332 (laminine-332 est le ligand préférentiel de l'intégrine $\alpha 6 \beta 4$), la deuxième quant à elle participe à une fonction d'anti-prolifération et de pro-adhésion à la laminine-332 (Basora et al., 1999; Beaulieu, 2010; Groulx et al., 2014). De plus, des études récentes montrent que l'intégrine $\alpha 6 \beta 4$ présente une très faible affinité de liaison

pour la laminine-511 (Nishiuchi et al., 2006; Taniguchi et al., 2009). En considérant cet ensemble de données, l'intégrine $\alpha 6 \beta 4$ n'est pas la plus indiquée ni pour lier la laminine-511 ni encore pour moduler la différenciation entérocytaire.

En ce qui concerne l'intégrine $\alpha 3 \beta 1$, son expression débute avec la formation des villosités et demeure préférentiellement associée aux cellules épithéliales villositaires de l'intestin adulte (Beaulieu, 1992; Perreault et al., 1995). Cependant, la réciprocité d'expression de l'intégrine $\alpha 3 \beta 1$ avec la laminine-511 va de pair avec une deuxième composante de la membrane basilaire intestinale, soit la laminine-332 (Teller et al., 2007), qui a été démontrée comme étant son ligand préférentiel (Carter et al., 1991; Delwel et al., 1994; Nishiuchi et al., 2006). Ce faisant, l'intégrine $\alpha 3 \beta 1$ pourrait être requise pour la régulation et/ou pour le maintien des cellules intestinales différenciées et ce, de concert avec la laminine-332 beaucoup plus que la laminine-511. D'autant plus que les cellules Caco-2/15 dont la différenciation est démontrée fortement modulée par l'action de la laminine-511 (Vachon and Beaulieu, 1995), n'expriment pas de niveaux important de la sous-unité d'intégrine $\alpha 3$ (Basora et al, données non publiés).

À la lumière de ces données, l'intégrine $\alpha 7 \beta 1$ pourrait représenter le récepteur préférentiel pour la laminine-511 dans l'épithélium intestinal. En effet, la co-localisation au niveau de l'axe crypte-villosité ainsi que les fonctions individuelles de l'intégrine $\alpha 7 \beta 1$ et de la laminine-511 pointent en faveur d'une association fonctionnelle de ces deux molécules dans la modulation du processus de la différenciation intestinale. D'autre part, l'intégrine $\alpha 7 \beta 1$ a été décrite pour réguler négativement l'expression de plusieurs sous-unités α d'intégrines. Parmi cela on retrouvent les sous-unité d'intégrines $\alpha 3$, $\alpha 5$ et $\alpha 6$ (Schober et al., 2000).

Néanmoins, bien que les connaissances actuelles permettent de présager une association fondamentale entre la laminine-511 et l'intégrine $\alpha 7 \beta 1$ dans le tissu intestinal, il faut garder une réserve par égard au contexte *in-vivo*. En effet, malgré la grande influence du stroma sur les fonctions des cellules épithéliales intestinales, sa contribution n'est pas considérée dans les études d'interactions entre la cellule et sa matrice extracellulaire.

4.2.2 Interaction de l'intégrine $\alpha 7\beta 1$ avec la laminine-511

Les fonctions induites par les laminines dépendent essentiellement de la nature, de l'affinité et de la force de leurs interactions avec les intégrines (Nishiuchi et al., 2006). De nombreuses équipes de recherche ont étudié les forces de liaison entre la laminine-511 et différentes intégrines. Les mesures d'affinités de liaisons rapportées pour l'intégrine $\alpha 7\beta 1$ sont pour la plupart particulièrement faibles, voir même impossibles à évaluer (Nishiuchi et al., 2006; Taniguchi et al., 2009; von der Mark et al., 2007). Cependant, l'association laminine-511/intégrine $\alpha 7\beta 1$ ne peut être écartée du fait que l'on reconnaît l'importance de la nature, le microenvironnement et les régulations physiologiques de la cellule dans le contrôle des interactions entre les cellules et la matrice extracellulaire.

Il est bien connu que la cellule peut ajuster la liaison de ses récepteurs à leurs ligands dans un but fonctionnel, en régulant individuellement ou conjointement leurs expressions et leurs activités de liaison. L'exemple de l'expression régulée de l'intégrine $\alpha 4\beta 1$ à la surface des cellules hématopoïétiques illustre parfaitement ces mécanismes de régulation cellulaire. En effet, le nombre d'intégrines $\alpha 4\beta 1$ est nettement diminué à la surface des cellules durant les stades tardifs de la différenciation hématopoïétique et ce, afin de favoriser la libération des cellules matures dans la circulation sanguine. Dans les cellules épithéliales intestinales, l'augmentation du nombre de molécules d'intégrine $\alpha 7\beta 1$ pourrait être un mode de régulation de sa liaison à la laminine-511. En effet, plusieurs interactions faibles créées par la liaison d'une multitude de molécules d'intégrines $\alpha 7\beta 1$ à la laminine-511, aboutirait probablement à garder la cellule ancrée à sa matrice. En conséquence, le signal propagé de cette interaction spécifique pourrait moduler des voies de signalisation intracellulaires impliquées dans le processus de la différenciation cellulaire intestinale.

La liaison d'un ligand sur l'extrémité extracellulaire d'une intégrine va généralement de pair avec un redressement de cette dernière dans une conformation pro-fonctionnelle. De la même manière, des changements dans

l'état métabolique des cellules pourraient entraîner la fixation ou la dissociation d'adaptateurs intracellulaires au niveau des queues cytoplasmiques de l'intégrine les forçant à se séparer et à se redresser dans une conformation droite de forte affinité. Récemment, l'intégrine $\alpha 7\beta 1$ a été décrite comme assujettie à une régulation physiologique du type rédox modulant son activité de liaison pour la laminine-111. En effet, il a été démontré que l'intégrine $\alpha 7\beta 1$ est oxydée simultanément en présence de H_2O_2 au niveau de résidus cystéines localisés dans le coude et le domaine calf-2, soient deux régions critiques pour son activation. Ces réactions d'oxydation au niveau de la structure de l'intégrine $\alpha 7\beta 1$ force le redressement de l'intégrine $\alpha 7\beta 1$ ce qui, augmentent son activité de liaison à la laminine-111. Il est intéressant de noter que les modulations de l'activité de liaison de l'intégrine $\alpha 7\beta 1$ pour la laminine-111 se sont uniquement reflétées dans les mesures du signal de la saturation de liaison au ligand et non pas dans les mesures des constantes de dissociation (de Rezende et al., 2012). Ce faisant, sachant que les cellules épithéliales intestinales sont sensibles aux traitements par les ROS (Reactive oxygen species) et qu'elles en produisent (Roques et al., 2002), l'existence d'un mécanisme rédox régulant l'activité de l'intégrine $\alpha 7\beta 1$ est envisageable dans notre contexte d'étude. Un tel mécanisme pourrait représenter une forme de régulation physiologique des cellules épithéliales intestinales leur permettant d'ajuster l'activité de la liaison de l'intégrine $\alpha 7\beta 1$ à la laminine-511 au cours de la différenciation entérocytaire.

4.2.3 Interaction de l'intégrine $\alpha 7\beta 1$ avec la laminine-521

Les connaissances actuelles quant aux critères de la liaison des intégrines aux laminines et les pré-requis qui gouvernent leurs interactions demeurent très limitées. Néanmoins, diverses évidences témoignent de l'importance des domaines LG (LG1-3) qui sont situés sur la chaîne α de la laminine et qui joueraient un rôle clé dans la modulation de l'activité de la liaison des intégrines aux laminines (Ido et al., 2004; Ido et al., 2006). De même, l'hétérodimérisation des trois chaînes α , β et γ de la laminine est décrite comme étant essentielle pour

son activation mais aussi pour sa reconnaissance par les intégrines (Ido et al., 2004; Sung et al., 1993). D'un autre côté, des études récentes spécifient que les résidus Glu conservés dans la région C-terminale des chaînes γ , $\gamma 1$ et $\gamma 2$, de la laminine sont aussi déterminants pour la reconnaissance et la liaison des molécules de laminines par les intégrines (Ido et al., 2007). Récemment, la région C-terminale de la chaîne β de la laminine a été aussi démontrée comme cruciale dans la modulation de l'activité de la liaison des intégrines avec les molécules de laminines (Taniguchi et al., 2009). En effet, ces auteurs ont montré que les laminines composées d'une chaîne $\beta 2$ se lient préférentiellement aux intégrines présentant l'exon X2 dans leurs domaines extracellulaires (Taniguchi et al., 2009).

L'identification de deux nouveaux variants de la sous-unité $\alpha 7$, $\alpha 7X1$ et $\alpha 7X2$, a permis d'apporter une plus grande diversité fonctionnelle pour l'intégrine $\alpha 7\beta 1$. Ces deux variants sont le résultat d'un épissage alternatif des régions codant pour les exons X1 et X2 situées dans la boucle de raccordement des lames III et IV, au niveau du domaine extracellulaire ``pale d'hélice- β `` de la sous-unité $\alpha 7$ (Collo et al., 1993; Ziober et al., 1993). Dans notre étude, nous montrons qu'au niveau de l'épithélium intestinal humain on a une expression exclusive du variant extracellulaire $\alpha 7BX2$ (Figure 18). En outre, les régions X1 et X2 ont été démontrées pour influencer la spécificité et l'affinité de la liaison de l'intégrine $\alpha 7\beta 1$ à ses ligands (Schober et al., 2000; von der Mark et al., 2007). L'intégrine $\alpha 7X1\beta 1$ présente une meilleure affinité de liaison pour la laminine -511 que pour les laminines-111 et -211, à l'encontre de l'intégrine $\alpha 7X2\beta 1$. De plus, les deux variants extracellulaires de l'intégrine $\alpha 7\beta 1$ divergent aussi dans leurs affinités de liaison pour la laminine-521. En effet, l'intégrine $\alpha 7X2\beta 1$ lie la laminine-521 avec une affinité quatre fois plus élevée que pour la laminine-511 (Taniguchi et al., 2009).

Dans les cellules épithéliales intestinales, Beaulieu et al., ont montré une expression spécifique de la chaîne $\beta 2$ de la laminine. Les auteurs ont décrit une déposition en quantité équivalente des deux chaînes $\beta 1$ et $\beta 2$ de la laminine combinées aux chaînes $\alpha 5$ et $\gamma 1$ au niveau de la MEC des cellules Caco-2/15. Ces deux chaînes β de laminine partagent aussi un même patron d'expression au

niveau de l'unité fonctionnelle intestinale qui englobe la villosité dans sa longueur (Beaulieu and Vachon, 1994). Jusqu'à présent, aucun rôle n'a été attribué à la laminine-521 et elle a été souvent associée à la laminine-511. Cependant, à l'issue des connaissances actuelles la perspective d'une association fonctionnelle entre l'intégrine $\alpha 7 \text{BX} 2 \beta 1$ et la laminine-521 prend de l'importance. De même, la laminine-521 pourrait être un ligand pour l'intégrine $\alpha 7 \text{BX} 2 \beta 1$ au niveau de l'épithélium intestinal au même degré que la laminine-511. Ainsi, l'étude de son rôle au niveau du tissu intestinal serait fort intéressante et pourrait apporter une meilleure compréhension des mécanismes régulateurs impliquant la membrane basilaire dans le processus d'acquisition de la différenciation entérocytaire.

4.3 Signalisations intracellulaires régulées par l'intégrine $\alpha 7 \text{B} \beta 1$

Les mécanismes moléculaires régulant la modulation du phénotype cellulaire intestinal commencent à peine à être compris. Cependant, la manière par laquelle la matrice extracellulaire influence ces mécanismes demeure encore méconnue. Dans la présente étude, nous avons étudié la contribution de l'intégrine $\alpha 7 \beta 1$, un récepteur à la laminine, dans la modulation du phénotype des cellules épithéliales intestinales. Lors des régulations fonctionnelles intestinales, les événements subséquents à l'engagement d'une intégrine sont encore très mal définis. Cependant, l'adhésion ainsi que la migration des cellules épithéliales sur des matrices de laminines ont été associées à l'activation d'évènements intracellulaires dépendants de la sous-unité $\beta 1$ de l'intégrine, parmi lesquels on note : des réarrangements au niveau du réseau d'actine, la phosphorylation/déphosphorylation de certaines composantes des adhésions focaux, par exemple FAK, paxillin et $p130^{\text{cas}}$, ainsi que l'activation de cascades de signalisation intracellulaires telle que celle de la phosphatidylinositol 3-kinase (Honore et al., 2000; Pageot et al., 2000; Sanders and Basson, 2000) (Yu et al., 2000).

En revanche, les facteurs activés au moment où les précurseurs des cellules épithéliales intestinales se différencient demeurent encore méconnus.

Seuls quelques indices attribuent à la laminine-511 une pression régulatrice sur l'expression de CDX-2, une homéoprotéine clé dans la régulation de la différenciation cellulaire intestinale (Lorentz et al., 1997). D'un autre côté, d'autres études ont démontré l'importance de la coopération entre CDX-2 et HNF-1 α , un facteur de transcription, pour l'initiation du programme de différenciation intestinale (Benoit et al., 2010). De même, un rôle a été attribué à SUZ12, un membre constructif du complexe polycomb PRC2, dans la répression du programme de différenciation entérocytaire (Benoit et al., 2012b). Dans ce même ordre d'idée, notre laboratoire a récemment identifié un effet original et majeur de la famille des kinases Src sur le programme de différenciation entérocytaire. Dans cette étude, nous avons montré que l'inhibition de l'activité de la kinase Src (pSrc^{Y416}) déclenche une hausse d'expression d'un large panel de marqueurs biochimiques représentatifs des événements de la polarisation épithéliale et de la différenciation terminale intestinale. De plus, nous avons observé une surexpression des facteurs de transcription CDX-2 et HNF-1 α et une baisse d'activité du complexe polycomb PRC2. Nos observations ont permis de suggérer qu'à la suite de son activation, la kinase Src peut exercer une régulation négative sur l'intégralité du processus de la différenciation entérocytaire (Seltana et al., 2013).

Dans la présente étude, nous montrons que l'inhibition de la sous-unité $\alpha 7B$ dans les cellules Caco-2/15 conduit à une activation précoce du programme global de la différenciation entérocytaire, une baisse d'activité de la kinase Src et une baisse rapide de la triméthylation sur l'histone H3 du complexe polcomb PRC2. Ces résultats suggèrent que l'intégrine $\alpha 7B\beta 1$ aussi bien que la kinase Src peuvent agir dans une même voie régulatrice, ce qui représenterait un nouveau mécanisme de régulation de la différenciation entérocytaire terminale. D'un autre côté, nos résultats montrent que le statut de l'intégrine $\alpha 7B\beta 1$ dans les cellules épithéliales intestinales peut assurément influencer l'activation de la kinase Src et potentiellement son action sur divers effecteurs de signalisation intracellulaire. Cependant, le mode d'action de l'intégrine $\alpha 7B\beta 1$ sur la kinase Src mérite une

plus ample étude et ce, afin de déterminer s'il implique une activation directe ou bien indirecte de cette dernière.

Au terme des événements reliés à la perte de l'intégrine $\alpha 7\text{B}\beta 1$ dans les cellules Caco-2/15, il est évident qu'il y a une large coordination fonctionnelle entre les différentes voies régulatrices principales qui gèrent l'acquisition de la différenciation entérocytaire terminale. Néanmoins, le fait que la simple perte d'une intégrine, jusqu'ici méconnue dans la biologie intestinale, puisse contourner la globalité des critères de la différenciation cellulaire et déclencher en même temps une multitude d'événements totalement dissociés au niveau cellulaire est inédit. En effet, le rôle clé de l'intégrine $\alpha 7\text{B}\beta 1$ mérite une plus grande investigation afin de clarifier le mécanisme exact l'impliquant dans la régulation des fonctions épithéliales dans l'intestin en développement et adulte.

4.3.1 Rôle de l'axe signalétique intégrine $\alpha 7\text{B}\beta 1$ /Src dans la polarisation cellulaire

L'importance de l'intégrine $\alpha 7\beta 1$ dans la modulation des mécanismes de la régulation intracellulaire a été largement documentée dans le tissu musculaire, plus particulièrement, en réponse à un stress ou à un dommage majeur. Parmi les voies de signalisation intracellulaire régulées par l'intégrine $\alpha 7\beta 1$: les voies JNK, p38 MAPK (Boppart et al., 2006) et ERK1/2 (Welser et al., 2007) sont les mieux décrites. Cependant, aucune association concrète entre $\alpha 7\beta 1$ et Src n'a été rapportée dans la littérature mis à part quelques indices et points de corrélations fonctionnels indirects. En effet, l'identification de régions homologues dans le domaine cytoplasmique du variant $\alpha 7\text{B}$ le rend potentiellement susceptible aux interactions spécifiques avec des adaptateurs de signalisation intracellulaire du type Sérine/thréonine et tyrosine phosphatase (Song et al., 1993). De ce fait, Src représenterait un partenaire potentiel pour l'intégrine $\alpha 7\text{B}\beta 1$.

L'intégrine $\alpha 7\text{B}\beta 1$ est assujettie à une régulation dépendante des ROS. En effet, des événements d'oxydation transitoires associés à une forte production locale des ROS, ont été observés dans les sites d'attachement de l'intégrine

$\alpha 7\beta 1$ à son ligand, la laminine-111 (de Rezende et al., 2012). D'un autre côté, il est bien connu que l'activité des kinases Src répond étroitement à une régulation rédox (Giannoni et al., 2010). En effet, Giannoni et al ont rapporté des événements d'oxydation/activation dépendante des ROS de la kinase Src dans les cellules épithéliales. Selon ces auteurs, la kinase Src affiche deux phases d'activation : une première phase modérée parallèle à la formation des adhésions focaux et indépendante des ROS et une deuxième phase maximale et tardive qui accompagne la production des ROS, l'étalement cellulaire et l'engagement de l'intégrine (Giannoni et al., 2005). Ceci est corroboré par nos résultats où nous observons un pic d'activité transitoire de la kinase Src dans les cellules Caco-2/15, concomitant à la hausse d'expression de la sous-unité $\alpha 7\beta$ (Basora et al., 1997). Durant les dix premiers jours de culture, les cellules Caco-2/15 montrent de faibles critères de différenciation et de polarisation (Vachon and Beaulieu, 1992; Vachon et al., 1996b). Cependant, elles sont capables de produire et de déposer les laminine-511/-521 au niveau de leur matrice extracellulaire et ce, dès l'atteinte de la confluence cellulaire (Beaulieu and Vachon, 1994; Vachon and Beaulieu, 1995). Ce qui nous permet de considérer l'hypothèse d'une potentielle régulation dépendante des ROS dans les cellules entérocytaires. En effet, une liaison potentielle de l'intégrine $\alpha 7\beta 1$ à la laminine-511/-521 pourrait soutenir l'activation directe et dépendante des ROS de la kinase Src dans les cellules Caco-2/15. La kinase Src, qui de surcroît, a été démontrée pour son effet spécifique sur l'intégrité des jonctions adhérentes (Canel et al., 2010). Un système de jonction intercellulaire qui influe grandement sur l'activation du programme de la différenciation cellulaire intestinale (Houde et al., 2001; Laprise et al., 2002).

Dans les cellules Caco-2 la perméabilité paracellulaire et l'organisation des jonctions adhérentes sont régulées par des mécanismes indépendants. En effet, l'augmentation des événements de la phosphorylation des tyrosines cause une désorganisation des jonctions adhérentes avec une perte de l'E-cadhérine dans leur composition et ceci, sans pour autant affecter ni l'organisation ni la fonctionnalité des jonctions serrées (Morgado-Diaz and de Souza, 2001). En outre, la signalisation dépendante de la sous-unité d'intégrine $\beta 1$ via la kinase Src

a été rapportée comme pouvant contrôler, d'une part, l'internalisation et la dynamique de l'E-cadhérine au niveau des jonctions adhérentes et, d'autre part, la force des adhésions cellule-cellule et le mouvement cellulaire collectif E-cadhérine-dépendant (Canel et al., 2010). Nos résultats montrent que l'inhibition de l'intégrine $\alpha 7 \text{B} \beta 1$ dans les cellules Caco-2/15, provoque une maturation des jonctions adhérentes démontrée par une plus grande concentration de l'E-cadhérine au niveau des surfaces de contacts cellule-cellule. Des observations similaires ont été rapportées à la suite de l'inhibition de la kinase Src au moyen de l'inhibiteur pharmacologique PP2 (Seltana et al., 2013). Ainsi, ces résultats permettent de suggérer que dans les cellules épithéliales intestinales, l'établissement et le maintien des jonctions adhérentes répondent à une régulation dépendante de l'axe de signalisation mettant en jeu l'intégrine $\alpha 7 \text{B} \beta 1$ et la kinase Src. En effet, il est fort probable que lors de l'inactivation de cet axe de signalisation, l'E-cadhérine est activement acheminée vers les zones de contacts cellule-cellule. Par conséquent, cet événement favorisera l'établissement précoce des jonctions adhérentes tel que l'on a observé, ainsi que leur maturation et leur fonctionnalité. Cette dernière suggestion est corroborée par l'activation précoce de la voie Lkb1 dans les cellules Caco-2/15 sh $\alpha 7 \text{B}$. cette voie a été préalablement associée à un rôle clé dans l'établissement et le maintien de la stabilité des jonctions adhérentes (Baas et al., 2004; Partanen et al., 2012) moyennant la régulation de l'expression de la E-cadhérine (Eneling et al., 2012; Roy et al., 2010). Par ailleurs, mis à part l'importance des jonctions adhérentes dans l'établissement de la polarisation cellulaire, ce complexe de jonctions intercellulaires a été préalablement démontré pour son implication dans l'activation des cascades de signalisation p38 MAPK / Pi3K et ce, de manière dépendante de l'E-cadhérine. Ces cascades de signalisation sont décrites comme étant responsables de l'expression des marqueurs essentiels de la différenciation entérocytaire (Houde et al., 2001; Laprise et al., 2002). Ces dernières données pourraient entre autre expliquer l'augmentation drastique et globale des marqueurs de la différenciation entérocytaire, la SI, CDX-2 et HNF1 α , qui est observée dans les cellules Caco-2/15 sh $\alpha 7 \text{B}$ et pourraient potentiellement résulter

de la perte de la répression de l'intégrine $\alpha 7\beta 1$ sur l'établissement des jonctions adhérentes dans les cellules épithéliales intestinales.

4.3.2 Rôle de l'intégrine $\alpha 7\beta 1$ dans la modulation de la signalisation d'ERK

Dans le muscle, l'intégrine $\alpha 7\beta 1$ a été associée à un rôle clé dans la répression de la prolifération cellulaire et ce, par la régulation négative de la signalisation MEK/ ERK1/2 (Welser et al., 2007). Cette même voie de signalisation compte plusieurs attributs fonctionnels dans l'intestin humain. En effet, plusieurs évidences témoignent de son importance dans le contrôle du processus de la prolifération des cellules épithéliales intestinales (Aliaga et al., 1999; Rhoads et al., 1997; Rivard et al., 1999). De même, la démonstration d'une implication cruciale de la voie MEK/ ERK1/2 dépendante de l'axe signalétique $\beta 1$ /Fak/Src dans la modulation de la survie des cellules épithéliales intestinales a été amplement fournie au niveau de la littérature (Beausejour et al., 2012; Beausejour et al., 2013; Bouchard et al., 2007; Bouchard et al., 2008; Vachon, 2011). En outre, il a été récemment démontré que l'activation constitutive de MEK peut contrôler négativement le processus de la différenciation intestinale (Lemieux et al., 2011). Ce faisant, la cascade de signalisation MEK/ERK 1/2 représenterait une cible potentielle de la régulation médiée par l'intégrine $\alpha 7\beta 1$. Cette suggestion est d'autant plus intéressante puisque la kinase Src, dont l'activation semble dépendre du statut de l'intégrine $\alpha 7\beta 1$ dans les cellules Caco-2/15, est un effecteur en amont de ERK1/2 dans la cascade de signalisation Ras/RAF/MEK/MAPK et qu'elle peut activer l'expression d'ERK 1/2.

Cependant, les répercussions associées à la voie de signalisation MEK/ERK1/2, dans le cadre du programme de différenciation entérocytaire, ne se vérifient pas dans tous les modèles de cellules épithéliales intestinales. En effet, les cellules Caco-2 post confluentes échappent à la régulation décrite de la signalisation d'ERK (Lemieux et al., 2011). Néanmoins, il demeure important de noter que de faibles niveaux d'expression des formes actives de MEK et P-ERK1/2 sont exprimés dans les cellules Caco-2 et qu'ils sont maintenus dans les cellules

différenciées (Aggarwal et al., 2011; Lemieux et al., 2011). Ces observations concordent avec ce qui a été décrit *in-vivo*, où la présence d'une forme active d'ERK a été détectée dans les compartiments intracellulaires des cellules de la villosité intestinale (Aliaga et al., 1999). Ceci suggère que la signalisation d'ERK est potentiellement impliquée dans la différenciation entérocytaire et ce, avec des attributions différentes que celles préalablement décrites. Cette hypothèse est appuyée par le profil d'expression d'ERK actif rapporté dans les cellules Caco-2, qui est associée majoritairement aux régions périjonctionnelles des cellules. D'un autre côté, l'expression d'une forme constitutivement active de MEK/ ERK1/2 dans les cellules Caco-2 post confluentes est décrite suffisante pour promouvoir une forte organisation de l'occludine et de ZO-1 au niveau des jonctions serrées (Aggarwal et al., 2011)

Lors de notre étude, suite à l'inhibition de l'expression de l'intégrine $\alpha 7 \beta 1$, nous avons observé un établissement précoce des jonctions serrées dans les cellules Caco-2/15. En effet, l'investigation en microscopie par immunofluorescence des cellules sh $\alpha 7 \beta 1$ nous a permis d'observer une forte organisation de ZO-1 aux surfaces intercellulaires, attestant de la maturation des jonctions. Nos résultats raliés aux différents témoignages présentés dans la littérature soutiennent la présence possible d'une forme active d'ERK1/2 dans les cellules Caco-2/15 sh $\alpha 7 \beta 1$. Le maintien de ERK1/2 actif dans les cellules Caco-2/15 différenciées, dépendrait potentiellement de l'action de l'axe signalétique de l'intégrine $\alpha 7 \beta 1$ -Src et, opèrerait en faveur de l'acquisition de la polarisation terminale et fonctionnelle des cellules absorbantes intestinales. Cette proposition se vérifie en partie par nos résultats qui montrent que l'inhibition ou l'activation de ces deux composantes suffit pour moduler drastiquement la maturation ainsi que l'expression de ZO-1 associés au système des jonctions serrées. Cependant, cette hypothèse demeure controversée puisqu'il est difficile d'expliquer que l'inhibition de l'axe signalétique intégrine $\alpha 7 \beta 1$ -Src n'entraînera pas une inhibition d'ERK1/2 mais favoriserait plutôt son activité. Une explication plausible serait de suggérer que la forme active d'ERK peut demeurer séquestrée dans les compartiments intracellulaires en réserve pour un rôle pro-différenciation des

entérocytes. Cette suggestion est appuyée par la localisation particulière d'ERK décrite *in-vivo* dans les cellules villositaires (Aliaga et al., 1999). Par ailleurs, la capacité récemment décrite d'un membre de la famille des protéines FHL « *Four and one-half LIM domain* » à interférer avec la fonction de signalisation d'ERK dans les cardiomyocytes, pourrait représenter un mécanisme de régulation potentiel en faveur de notre hypothèse. En effet, la protéine FHL2 peut lier ERK1/2 au niveau du cytoplasme et inhiber sa translocation fonctionnelle vers le noyau (Purcell et al., 2004)

Dans la littérature, on recense cinq membres dans cette famille de protéines et qui sont FHL1-4 et ACT. Ces dernières ont la particularité de présenter dans leur structure quatre domaines LIM et un motif avec un seul doigt de Zinc à l'extrémité amino-terminale. Chaque domaine LIM se compose de deux motifs en doigt de Zinc; d'où l'aptitude des protéines FHL à réguler un large spectre de fonctions cellulaires notamment, les interactions inter-protéines ainsi que les fonctions des protéines du cytosquelette, des enzymes et des facteurs de transcriptions. La protéine FHL2 présente un patron d'expression ubiquitaire dans le corps humain et elle est la plus documentée de sa famille dans la littérature. Une hausse d'expression de FHL2 a été rapportée dans le cancer du colon ainsi que dans certains modèles cellulaires épithéliaux intestinaux. D'autre part, la protéine FHL2 est décrite comme pouvant lier une multitude de molécules dans les compartiments intracellulaires. En effet, en plus de sa capacité à lier ERK 1/2, FHL2 possède le potentiel de s'associer à l'intégrine $\alpha 7 \beta 1$ au niveau des complexes d'adhésions focaux (Samson et al., 2004). Ce faisant, on peut émettre l'hypothèse qu'une partie du rôle de l'intégrine $\alpha 7 \beta 1$ dans les entérocytes serait de maintenir ERK1/2 actif dans le cytoplasme et inhiber sa translocation dans le noyau par l'intermédiaire de FHL2, en plus de jouer un rôle dans la modulation de la cascade de signalisation qui conduit à l'activation de ERK 1/2.

4.4 Conclusion finale

Notre étude fournit un mécanisme potentiel par lequel l'adhérence à la laminine peut influencer le phénotype cellulaire et suggère un rôle bien plus important de ce que l'on préconisait pour l'intégrine $\alpha 7\beta 1$ dans la biologie intestinale. La participation des intégrines a jusqu'ici été appréciée et investiguée dans l'activation d'évènements associés à une régulation fonctionnelle et non pas l'inhibition. Cependant, l'intégrine $\alpha 7\beta 1$ et probablement d'autres molécules d'adhésion aux laminines peuvent véhiculer des signaux d'inhibitions essentiels aux fonctions cellulaires, telle que la différenciation entérocytaire dans le cas échéant, et la rupture avec la membrane basilaire ainsi que la perte de ce signal inhibiteur pourrait de ce fait déréguler l'équilibre et l'homéostasie intestinale et s'associer à divers pathologies graves. La figure 25, résume les mécanismes de régulations discutés dans la section 4.3 et présente les signalisations intracellulaires possibles en aval à une activation/ inactivation de l'intégrine $\alpha 7\beta 1$. Les voies de signalisations intracellulaires connues pour moduler la différenciation entérocytaire dans l'intestin humain sont aussi résumées dans la figure 25.

Sachant qu'en réponse à un stress ou une modification physiologique, les cellules peuvent moduler l'expression de leurs récepteurs membranaires ainsi que leur production au niveau de la matrice extracellulaire. Il serait donc judicieux d'utiliser notre modèle cellulaire Caco-2/15 sh $\alpha 7\beta$ afin d'étudier la composition de leur matrice extracellulaire ainsi que les récepteurs de surface qu'elles expriment. En effet, notre modèle cellulaire représente un outil de choix pour une meilleure compréhension des mécanismes impliqués dans la maintenance du processus de la différenciation dans les cellules absorbantes. L'inhibition de l'intégrine $\alpha 7\beta 1$ a élevée rapidement les cellules Caco-2/15 au stade d'entérocytes matures et fonctionnels de la villosité intestinale. Ce faisant, on pourrait penser que ces cellules ont éventuellement aussi acquis la capacité d'exprimer et de produire de nouvelles molécules qui parallèles à leur nouveau statut cellulaire et qui soit plus représentatifs de la villosité intestinale.

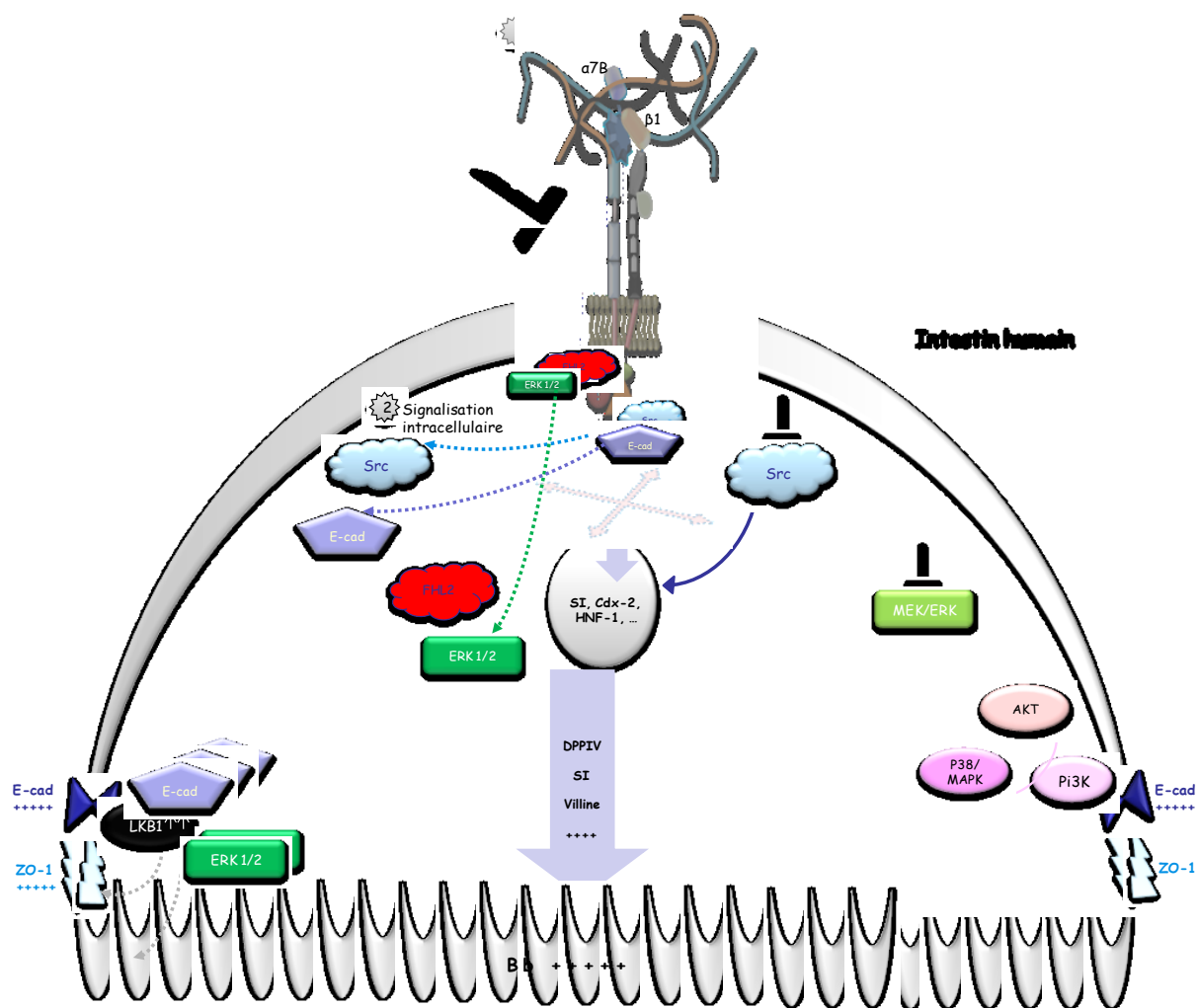


Figure 25 : Signalisations intracellulaires régulées par l'intégrine $\alpha 7 \beta 1$.

Toutefois et de manière générale, il faut garder en tête que notre étude a été réalisée dans un modèle cellulaire en culture standard. Aussi, bien que l'on souhaite qu'il représente le contexte *in-vivo*, il demeure que certaines composantes biologiques y sont absentes, notamment, la contribution du stroma dans la composition de la lame basale ou encore par la sécrétion de facteurs solubles. Ceci dit, l'utilisation de modèles de coculture cellulaire épithélium/stroma pourrait représenter une approche d'étude *in-vitro* plus réaliste et plus concrète. Dans le contexte d'étude du système intestinal, la mise en culture de cellules

épithéliales « Caco-2/15 » sur un support de myofibroblastes « HIM » a permis de créer spontanément un environnement riche où sont exprimées et secrétées la majorité des molécules identifiées au niveau de l'épithélium intestinal humain. Au sein de ce modèle de coculture, les deux couches cellulaires s'échangent des informations en continu, sont sensibles aux modulations de leur environnement et même qu'en réponse à un stress elles collaborent activement pour rétablir l'équilibre global et ce, de manière fidèle au contexte *in-vivo* (Seltana et al., 2010). Ce faisant, le modèle de co-culture Caco-2/15/HIM pourrait être le maillon qui allierait l'expérimentation *in-vitro* au contexte *in-vivo* et qui permettrait de vérifier l'ampleur de l'action de l'intégrine $\alpha 7\text{B}\beta 1$ sur les fonctions des cellules épithéliales intestinales dans un environnement plus complet.

REMERCIEMENTS

Je tiens tout d'abord à remercier mon directeur de recherche, le Dr Jean-François Beaulieu, qui m'a assisté et encadré tout le long de ce grand voyage qu'est mon doctorat de recherche. Ses connaissances étendues de la biologie cellulaire, sa compétence, sa grande passion pour la recherche et son amitié ont été mon plus grand gain de cette expérience. À sa façon il a su me pousser à me surpasser pour donner toujours le meilleur et à acquérir la maturité scientifique nécessaire pour mener à terme ce travail. Je lui suis très reconnaissante également pour le support qu'il m'a donné dans certaines périodes difficiles de mes études doctorales.

Mes remerciements s'adressent aussi aux membres du laboratoire du Dr Beaulieu que j'ai eu la chance de côtoyer et de faire partie de leur équipe. À Nuria Basora, Elizabeth Herring et Éric Trembley pour leur grande disponibilité, leurs conseils, leur appui et leur amitié sincère. J'aimerais aussi remercier mes collègues étudiants, Amel, David, Jean-François, Manon, Nancy, Salah, Taoufik et Yannick pour leur collaboration et leur bonne humeur.

Mes remerciements vont particulièrement à mon ami et amour Mehdi, pour sa présence, son soutien et sa patience. À mes parents Hamadi & Aziza pour leur sacrifice, leur appui continu, leur confiance et leur amour inconditionnel. À mes sœurs, Amel, Najeh, Hayet et Anissa pour leur douce présence dans ma vie. À ma belle maman Nedra pour son soutien et sa compréhension ainsi que mes beaux frères Walid, sa douce épouse Olfa et Nour.

Mes remerciements s'adressent à tous les membres de jury, les Drs Pierre H. Vachon, Ahmed Chraïbi et Lucie Germain qui ont bien voulu évaluer ma thèse de doctorat.

Enfin, mes remerciements à tout le corps professoral, étudiants et le personnel du département d'anatomie et de biologie cellulaire notamment, Suzanne Topping pour ses grandes qualités humaines et professionnelles et sa merveilleuse amitié.

Références

- Aggarwal, S., Suzuki, T., Taylor, W. L., Bhargava, A. and Rao, R. K.** (2011). Contrasting effects of ERK on tight junction integrity in differentiated and under-differentiated Caco-2 cell monolayers. *Biochem J* **433**, 51-63.
- Aliaga, J. C., Deschenes, C., Beaulieu, J. F., Calvo, E. L. and Rivard, N.** (1999). Requirement of the MAP kinase cascade for cell cycle progression and differentiation of human intestinal cells. *Am J Physiol* **277**, G631-41.
- Andoh, A., Bamba, S., Brittan, M., Fujiyama, Y. and Wright, N. A.** (2007). Role of intestinal subepithelial myofibroblasts in inflammation and regenerative response in the gut. *Pharmacol Ther* **114**, 94-106.
- Antonowicz, I., Chang, S. K. and Grand, R. J.** (1974). Development and distribution of lysosomal enzymes and disaccharidases in human fetal intestine. *Gastroenterology* **67**, 51-8.
- Aumailley, M., Bruckner-Tuderman, L., Carter, W. G., Deutzmann, R., Edgar, D., Ekblom, P., Engel, J., Engvall, E., Hohenester, E., Jones, J. C. et al.** (2005). A simplified laminin nomenclature. *Matrix Biol* **24**, 326-32.
- Baas, A. F., Smit, L. and Clevers, H.** (2004). LKB1 tumor suppressor protein: PARtaker in cell polarity. *Trends Cell Biol* **14**, 312-9.
- Balda, M. S. and Matter, K.** (2008). Tight junctions at a glance. *J Cell Sci* **121**, 3677-82.
- Barker, N., van de Wetering, M. and Clevers, H.** (2008a). The intestinal stem cell. *Genes Dev* **22**, 1856-64.
- Barker, N., van Es, J. H., Jaks, V., Kasper, M., Snippert, H., Toftgard, R. and Clevers, H.** (2008b). Very long-term self-renewal of small intestine, colon, and hair follicles from cycling Lgr5+ve stem cells. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **73**, 351-6.
- Basora, N., Desloges, N., Chang, Q., Bouatrouss, Y., Gosselin, J., Poisson, J., Sheppard, D. and Beaulieu, J. F.** (1998). Expression of the alpha9beta1 integrin in human colonic epithelial cells: resurgence of the fetal phenotype in a subset of colon cancers and adenocarcinoma cell lines. *Int J Cancer* **75**, 738-43.
- Basora, N., Herring-Gillam, F. E., Boudreau, F., Perreault, N., Pageot, L. P., Simoneau, M., Bouatrouss, Y. and Beaulieu, J. F.** (1999). Expression of functionally distinct variants of the beta(4)A integrin subunit in relation to the differentiation state in human intestinal cells. *J Biol Chem* **274**, 29819-25.
- Basora, N., Vachon, P. H., Herring-Gillam, F. E., Perreault, N. and Beaulieu, J. F.** (1997). Relation between integrin alpha7Bbeta1 expression in human intestinal cells and enterocytic differentiation. *Gastroenterology* **113**, 1510-21.
- Basson, M. D.** (2001). In vitro evidence for matrix regulation of intestinal epithelial biology during mucosal healing. *Life Sci* **69**, 3005-18.
- Basson, M. D., Modlin, I. M., Flynn, S. D., Jena, B. P. and Madri, J. A.** (1992a). Independent modulation of enterocyte migration and proliferation by growth factors, matrix proteins, and pharmacologic agents in an in vitro model of mucosal healing. *Surgery* **112**, 299-307; discussion 307-8.

- Basson, M. D., Modlin, I. M. and Madri, J. A.** (1992b). Human enterocyte (Caco-2) migration is modulated in vitro by extracellular matrix composition and epidermal growth factor. *J Clin Invest* **90**, 15-23.
- Beaulieu, J. F.** (1992). Differential expression of the VLA family of integrins along the crypt-villus axis in the human small intestine. *J Cell Sci* **102 (Pt 3)**, 427-36.
- Beaulieu, J. F.** (1997). Extracellular matrix components and integrins in relationship to human intestinal epithelial cell differentiation. *Prog Histochem Cytochem* **31**, 1-78.
- Beaulieu, J. F.** (2010). Integrin alpha6beta4 in colorectal cancer. *World J Gastrointest Pathophysiol* **1**, 3-11.
- Beaulieu, J. F., Nichols, B. and Quaroni, A.** (1989). Posttranslational regulation of sucrase-isomaltase expression in intestinal crypt and villus cells. *J Biol Chem* **264**, 20000-11.
- Beaulieu, J. F. and Quaroni, A.** (1991). Clonal analysis of sucrase-isomaltase expression in the human colon adenocarcinoma Caco-2 cells. *Biochem J* **280 (Pt 3)**, 599-608.
- Beaulieu, J. F. and Vachon, P. H.** (1994). Reciprocal expression of laminin A-chain isoforms along the crypt-villus axis in the human small intestine. *Gastroenterology* **106**, 829-39.
- Beaulieu, J. F., Vachon, P. H. and Chartrand, S.** (1991). Immunolocalization of extracellular matrix components during organogenesis in the human small intestine. *Anat Embryol (Berl)* **183**, 363-9.
- Beaulieu, J. F., Weiser, M. M., Herrera, L. and Quaroni, A.** (1990). Detection and characterization of sucrase-isomaltase in adult human colon and in colonic polyps. *Gastroenterology* **98**, 1467-77.
- Beausejour, M., Noel, D., Thibodeau, S., Bouchard, V., Harnois, C., Beaulieu, J. F., Demers, M. J. and Vachon, P. H.** (2012). Integrin/Fak/Src-mediated regulation of cell survival and anoikis in human intestinal epithelial crypt cells: selective engagement and roles of PI3-K isoform complexes. *Apoptosis* **17**, 566-78.
- Beausejour, M., Thibodeau, S., Demers, M. J., Bouchard, V., Gauthier, R., Beaulieu, J. F. and Vachon, P. H.** (2013). Suppression of anoikis in human intestinal epithelial cells: differentiation state-selective roles of alpha2beta1, alpha3beta1, alpha5beta1, and alpha6beta4 integrins. *BMC Cell Biol* **14**, 53.
- Belkin, A. M. and Stepp, M. A.** (2000). Integrins as receptors for laminins. *Microsc Res Tech* **51**, 280-301.
- Benoit, Y. D., Groulx, J. F., Gagne, D. and Beaulieu, J. F.** RGD-Dependent Epithelial Cell-Matrix Interactions in the Human Intestinal Crypt. *J Signal Transduct* **2012**, 248759.
- Benoit, Y. D., Groulx, J. F., Gagne, D. and Beaulieu, J. F.** (2012a). RGD-Dependent Epithelial Cell-Matrix Interactions in the Human Intestinal Crypt. *J Signal Transduct* **2012**, 248759.
- Benoit, Y. D., Lepage, M. B., Khalfaoui, T., Tremblay, E., Basora, N., Carrier, J. C., Gudas, L. J. and Beaulieu, J. F.** (2012b). Polycomb repressive complex 2 impedes intestinal cell terminal differentiation. *J Cell Sci* **125**, 3454-63.

- Benoit, Y. D., Lussier, C., Ducharme, P. A., Sivret, S., Schnapp, L. M., Basora, N. and Beaulieu, J. F.** (2009). Integrin $\alpha 8 \beta 1$ regulates adhesion, migration and proliferation of human intestinal crypt cells via a predominant RhoA/ROCK-dependent mechanism. *Biol Cell* **101**, 695-708.
- Benoit, Y. D., Pare, F., Francoeur, C., Jean, D., Tremblay, E., Boudreau, F., Escaffit, F. and Beaulieu, J. F.** Cooperation between HNF-1 α , Cdx2, and GATA-4 in initiating an enterocytic differentiation program in a normal human intestinal epithelial progenitor cell line. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **298**, G504-17.
- Benoit, Y. D., Pare, F., Francoeur, C., Jean, D., Tremblay, E., Boudreau, F., Escaffit, F. and Beaulieu, J. F.** (2010). Cooperation between HNF-1 α , Cdx2, and GATA-4 in initiating an enterocytic differentiation program in a normal human intestinal epithelial progenitor cell line. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **298**, G504-17.
- Bjerknes, M. and Cheng, H.** (2005). Gastrointestinal stem cells. II. Intestinal stem cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **289**, G381-7.
- Blikslager, A. T., Moeser, A. J., Gookin, J. L., Jones, S. L. and Odle, J.** (2007). Restoration of barrier function in injured intestinal mucosa. *Physiol Rev* **87**, 545-64.
- Blumberg, R. S., Li, L., Nusrat, A., Parkos, C. A., Rubin, D. C. and Carrington, J. L.** (2008). Recent insights into the integration of the intestinal epithelium within the mucosal environment in health and disease. *Mucosal Immunol* **1**, 330-4.
- Boppart, M. D., Burkin, D. J. and Kaufman, S. J.** (2006). $\alpha 7 \beta 1$ -integrin regulates mechanotransduction and prevents skeletal muscle injury. *Am J Physiol Cell Physiol* **290**, C1660-5.
- Bosse, T., Fialkovich, J. J., Piaseckyj, C. M., Beuling, E., Broekman, H., Grand, R. J., Montgomery, R. K. and Krasinski, S. D.** (2007). Gata4 and Hnf1 α are partially required for the expression of specific intestinal genes during development. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **292**, G1302-14.
- Bouatrouss, Y., Herring-Gillam, F. E., Gosselin, J., Poisson, J. and Beaulieu, J. F.** (2000). Altered expression of laminins in Crohn's disease small intestinal mucosa. *Am J Pathol* **156**, 45-50.
- Bouchard, V., Demers, M. J., Thibodeau, S., Laquerre, V., Fujita, N., Tsuruo, T., Beaulieu, J. F., Gauthier, R., Vezina, A., Villeneuve, L. et al.** (2007). Fak/Src signaling in human intestinal epithelial cell survival and anoikis: differentiation state-specific uncoupling with the PI3-K/Akt-1 and MEK/Erk pathways. *J Cell Physiol* **212**, 717-28.
- Bouchard, V., Harnois, C., Demers, M. J., Thibodeau, S., Laquerre, V., Gauthier, R., Vezina, A., Noel, D., Fujita, N., Tsuruo, T. et al.** (2008). B1 integrin/Fak/Src signaling in intestinal epithelial crypt cell survival: integration of complex regulatory mechanisms. *Apoptosis* **13**, 531-42.
- Boudreau, F., Lussier, C. R., Mongrain, S., Darsigny, M., Drouin, J. L., Doyon, G., Suh, E. R., Beaulieu, J. F., Rivard, N. and Perreault, N.** (2007). Loss of cathepsin L activity promotes claudin-1 overexpression and intestinal neoplasia. *Faseb J* **21**, 3853-65.

- Boudreau, F., Rings, E. H., Swain, G. P., Sinclair, A. M., Suh, E. R., Silberg, D. G., Scheuermann, R. H. and Traber, P. G.** (2002). A novel colonic repressor element regulates intestinal gene expression by interacting with Cux/CDP. *Mol Cell Biol* **22**, 5467-78.
- Burke, R. D.** (1999). Invertebrate integrins: structure, function, and evolution. *Int Rev Cytol* **191**, 257-84.
- Burkin, D. J. and Kaufman, S. J.** (1999). The alpha7beta1 integrin in muscle development and disease. *Cell Tissue Res* **296**, 183-90.
- Calderwood, D. A., Fujioka, Y., de Pereda, J. M., Garcia-Alvarez, B., Nakamoto, T., Margolis, B., McGlade, C. J., Liddington, R. C. and Ginsberg, M. H.** (2003). Integrin beta cytoplasmic domain interactions with phosphotyrosine-binding domains: a structural prototype for diversity in integrin signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 2272-7.
- Canel, M., Serrels, A., Miller, D., Timpson, P., Serrels, B., Frame, M. C. and Brunton, V. G.** (2010). Quantitative in vivo imaging of the effects of inhibiting integrin signaling via Src and FAK on cancer cell movement: effects on E-cadherin dynamics. *Cancer Res* **70**, 9413-22.
- Cao, R. and Zhang, Y.** (2004). SUZ12 is required for both the histone methyltransferase activity and the silencing function of the EED-EZH2 complex. *Mol Cell* **15**, 57-67.
- Carter, W. G., Ryan, M. C. and Gahr, P. J.** (1991). Epiligrin, a new cell adhesion ligand for integrin alpha 3 beta 1 in epithelial basement membranes. *Cell* **65**, 599-610.
- Chantret, I., Barbat, A., Dussaulx, E., Brattain, M. G. and Zweibaum, A.** (1988). Epithelial polarity, villin expression, and enterocytic differentiation of cultured human colon carcinoma cells: a survey of twenty cell lines. *Cancer Res* **48**, 1936-42.
- Cheng, H. and Leblond, C. P.** (1974). Origin, differentiation and renewal of the four main epithelial cell types in the mouse small intestine. V. Unitarian Theory of the origin of the four epithelial cell types. *Am J Anat* **141**, 537-61.
- Clayburgh, D. R., Shen, L. and Turner, J. R.** (2004). A porous defense: the leaky epithelial barrier in intestinal disease. *Lab Invest* **84**, 282-91.
- Collo, G., Starr, L. and Quaranta, V.** (1993). A new isoform of the laminin receptor integrin alpha 7 beta 1 is developmentally regulated in skeletal muscle. *J Biol Chem* **268**, 19019-24.
- Cross, H. S. and Quaroni, A.** (1991). Inhibition of sucrose-isomaltase expression by EGF in the human colon adenocarcinoma cells Caco-2. *Am J Physiol* **261**, C1173-83.
- Czernichow, B., Simon-Assmann, P., Keding, M., Arnold, C., Parache, M., Marescaux, J., Zweibaum, A. and Haffen, K.** (1989). Sucrase-isomaltase expression and enterocytic ultrastructure of human colorectal tumors. *Int J Cancer* **44**, 238-44.
- De Arcangelis, A., Neuville, P., Boukamel, R., Lefebvre, O., Keding, M. and Simon-Assmann, P.** (1996). Inhibition of laminin alpha 1-chain expression leads to alteration of basement membrane assembly and cell differentiation. *J Cell Biol* **133**, 417-30.

- de Rezende, F. F., Martins Lima, A., Niland, S., Wittig, I., Heide, H., Schroder, K. and Eble, J. A.** (2012). Integrin $\alpha 7 \beta 1$ is a redox-regulated target of hydrogen peroxide in vascular smooth muscle cell adhesion. *Free Radic Biol Med* **53**, 521-31.
- Delwel, G. O., de Melker, A. A., Hogervorst, F., Jaspars, L. H., Fles, D. L., Kuikman, I., Lindblom, A., Paulsson, M., Timpl, R. and Sonnenberg, A.** (1994). Distinct and overlapping ligand specificities of the $\alpha 3 \beta 1$ and $\alpha 6 \beta 1$ integrins: recognition of laminin isoforms. *Mol Biol Cell* **5**, 203-15.
- Denker, B. M. and Nigam, S. K.** (1998). Molecular structure and assembly of the tight junction. *Am J Physiol* **274**, F1-9.
- Deschenes, C., Vezina, A., Beaulieu, J. F. and Rivard, N.** (2001). Role of p27(Kip1) in human intestinal cell differentiation. *Gastroenterology* **120**, 423-38.
- Doe, J. A., Wuebbles, R. D., Allred, E. T., Rooney, J. E., Elorza, M. and Burkin, D. J.** Transgenic overexpression of the $\alpha 7$ integrin reduces muscle pathology and improves viability in the dy(W) mouse model of merosin-deficient congenital muscular dystrophy type 1A. *J Cell Sci* **124**, 2287-97.
- Dufour, G., Demers, M. J., Gagne, D., Dydensborg, A. B., Teller, I. C., Bouchard, V., Degongre, I., Beaulieu, J. F., Cheng, J. Q., Fujita, N. et al.** (2004). Human intestinal epithelial cell survival and anoikis. Differentiation state-distinct regulation and roles of protein kinase B/Akt isoforms. *J Biol Chem* **279**, 44113-22.
- Dydensborg, A. B., Herring, E., Auclair, J., Tremblay, E. and Beaulieu, J. F.** (2006). Normalizing genes for quantitative RT-PCR in differentiating human intestinal epithelial cells and adenocarcinomas of the colon. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **290**, G1067-74.
- Dydensborg, A. B., Teller, I. C., Basora, N., Groulx, J. F., Auclair, J., Francoeur, C., Escaffit, F., Pare, F., Herring, E., Menard, D. et al.** (2009a). Differential expression of the integrins $\alpha 6 \beta 4$ and $\alpha 6 \beta 4$ along the crypt-villus axis in the human small intestine. *Histochem Cell Biol* **131**, 531-6.
- Dydensborg, A. B., Teller, I. C., Groulx, J. F., Basora, N., Pare, F., Herring, E., Gauthier, R., Jean, D. and Beaulieu, J. F.** (2009b). Integrin $\alpha 6 \beta 4$ inhibits colon cancer cell proliferation and c-Myc activity. *BMC Cancer* **9**, 223.
- Echtermeyer, F., Schober, S., Poschl, E., von der Mark, H. and von der Mark, K.** (1996). Specific induction of cell motility on laminin by $\alpha 7$ integrin. *J Biol Chem* **271**, 2071-5.
- Eneling, K., Brion, L., Pinto, V., Pinho, M. J., Sznajder, J. I., Mochizuki, N., Emoto, K., Soares-da-Silva, P. and Bertorello, A. M.** (2012). Salt-inducible kinase 1 regulates E-cadherin expression and intercellular junction stability. *Faseb J* **26**, 3230-9.
- Escaffit, F., Boudreau, F. and Beaulieu, J. F.** (2005a). Differential expression of claudin-2 along the human intestine: Implication of GATA-4 in the maintenance of claudin-2 in differentiating cells. *J Cell Physiol* **203**, 15-26.
- Escaffit, F., Perreault, N., Jean, D., Francoeur, C., Herring, E., Rancourt, C., Rivard, N., Vachon, P. H., Pare, F., Boucher, M. P. et al.** (2005b). Repressed

E-cadherin expression in the lower crypt of human small intestine: a cell marker of functional relevance. *Exp Cell Res* **302**, 206-20.

Francoeur, C., Bouatrouss, Y., Seltana, A., Pinchuk, I. V., Vachon, P. H., Powell, D. W., Sawan, B., Seidman, E. G. and Beaulieu, J. F. (2008).

Degeneration of the Pericryptal Myofibroblast Sheath by Proinflammatory Cytokines in Inflammatory Bowel Diseases. *Gastroenterology*.

Francoeur, C., Escaffit, F., Vachon, P. H. and Beaulieu, J. F. (2004).

Proinflammatory cytokines TNF-alpha and IFN-gamma alter laminin expression under an apoptosis-independent mechanism in human intestinal epithelial cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **287**, G592-8.

Gagne, D., Groulx, J. F., Benoit, Y. D., Basora, N., Herring, E., Vachon, P. H. and Beaulieu, J. F. Integrin-linked kinase regulates migration and proliferation of human intestinal cells under a fibronectin-dependent mechanism. *J Cell Physiol* **222**, 387-400.

Gagne, D., Groulx, J. F., Benoit, Y. D., Basora, N., Herring, E., Vachon, P. H. and Beaulieu, J. F. (2010). Integrin-linked kinase regulates migration and proliferation of human intestinal cells under a fibronectin-dependent mechanism. *J Cell Physiol* **222**, 387-400.

Garrod, D. R. (1993). Desmosomes and hemidesmosomes. *Curr Opin Cell Biol* **5**, 30-40.

Geiger, B., Spatz, J. P. and Bershadsky, A. D. (2009). Environmental sensing through focal adhesions. *Nat Rev Mol Cell Biol* **10**, 21-33.

Giancotti, F. G. and Ruoslahti, E. (1999). Integrin signaling. *Science* **285**, 1028-32.

Giannoni, E., Buricchi, F., Raugei, G., Ramponi, G. and Chiarugi, P. (2005). Intracellular reactive oxygen species activate Src tyrosine kinase during cell adhesion and anchorage-dependent cell growth. *Mol Cell Biol* **25**, 6391-403.

Giannoni, E., Taddei, M. L. and Chiarugi, P. (2010). Src redox regulation: again in the front line. *Free Radic Biol Med* **49**, 516-27.

Gottschalk, K. E. (2005). A coiled-coil structure of the alpha11bbeta3 integrin transmembrane and cytoplasmic domains in its resting state. *Structure* **13**, 703-12.

Groulx, J. F., Giroux, V., Beausejour, M., Boudjadi, S., Basora, N., Carrier, J. C. and Beaulieu, J. F. (2014). Integrin alpha6A splice variant regulates proliferation and the Wnt/beta-catenin pathway in human colorectal cancer cells. *Carcinogenesis*.

Guo, C., Willem, M., Werner, A., Raivich, G., Emerson, M., Neyses, L. and Mayer, U. (2006). Absence of alpha 7 integrin in dystrophin-deficient mice causes a myopathy similar to Duchenne muscular dystrophy. *Hum Mol Genet* **15**, 989-98.

Hauri, H. P., Sterchi, E. E., Bienz, D., Fransen, J. A. and Marxer, A. (1985). Expression and intracellular transport of microvillus membrane hydrolases in human intestinal epithelial cells. *J Cell Biol* **101**, 838-51.

Hawley, S. A., Boudeau, J., Reid, J. L., Mustard, K. J., Udd, L., Makela, T. P., Alessi, D. R. and Hardie, D. G. (2003). Complexes between the LKB1 tumor

suppressor, STRAD alpha/beta and MO25 alpha/beta are upstream kinases in the AMP-activated protein kinase cascade. *J Biol* **2**, 28.

Hocker, M. and Wiedenmann, B. (1998). Molecular mechanisms of enteroendocrine differentiation. *Ann N Y Acad Sci* **859**, 160-74.

Honore, S., Pichard, V., Penel, C., Rigot, V., Prev t, C., Marvaldi, J., Briand, C. and Rognoni, J. B. (2000). Outside-in regulation of integrin clustering processes by ECM components per se and their involvement in actin cytoskeleton organization in a colon adenocarcinoma cell line. *Histochem Cell Biol* **114**, 323-35.

Houde, M., Laprise, P., Jean, D., Blais, M., Asselin, C. and Rivard, N. (2001). Intestinal epithelial cell differentiation involves activation of p38 mitogen-activated protein kinase that regulates the homeobox transcription factor CDX2. *J Biol Chem* **276**, 21885-94.

Hynes, R. O. (2002). Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines. *Cell* **110**, 673-87.

Ido, H., Harada, K., Futaki, S., Hayashi, Y., Nishiuchi, R., Natsuka, Y., Li, S., Wada, Y., Combs, A. C., Ervasti, J. M. et al. (2004). Molecular dissection of the alpha-dystroglycan- and integrin-binding sites within the globular domain of human laminin-10. *J Biol Chem* **279**, 10946-54.

Ido, H., Harada, K., Yagi, Y. and Sekiguchi, K. (2006). Probing the integrin-binding site within the globular domain of laminin-511 with the function-blocking monoclonal antibody 4C7. *Matrix Biol* **25**, 112-7.

Ido, H., Nakamura, A., Kobayashi, R., Ito, S., Li, S., Futaki, S. and Sekiguchi, K. (2007). The requirement of the glutamic acid residue at the third position from the carboxyl termini of the laminin gamma chains in integrin binding by laminins. *J Biol Chem* **282**, 11144-54.

Karuman, P., Gozani, O., Odze, R. D., Zhou, X. C., Zhu, H., Shaw, R., Brien, T. P., Bozzuto, C. D., Ooi, D., Cantley, L. C. et al. (2001). The Peutz-Jegher gene product LKB1 is a mediator of p53-dependent cell death. *Mol Cell* **7**, 1307-19.

Kaufman, S. J., Foster, R. F., Haye, K. R. and Faiman, L. E. (1985). Expression of a developmentally regulated antigen on the surface of skeletal and cardiac muscle cells. *J Cell Biol* **100**, 1977-87.

Keller, P., Zwicker, E., Mantei, N. and Semenza, G. (1992). The levels of lactase and of sucrase-isomaltase along the rabbit small intestine are regulated both at the mRNA level and post-translationally. *FEBS Lett* **313**, 265-9.

Kramer, R. H., Vu, M. P., Cheng, Y. F., Ramos, D. M., Timpl, R. and Waleh, N. (1991). Laminin-binding integrin alpha 7 beta 1: functional characterization and expression in normal and malignant melanocytes. *Cell Regul* **2**, 805-17.

Lapointe, T. K., O'Connor, P. M. and Buret, A. G. (2009). The role of epithelial malfunction in the pathogenesis of enteropathogenic E. coli-induced diarrhea. *Lab Invest* **89**, 964-70.

Laprise, P., Chailier, P., Houde, M., Beaulieu, J. F., Boucher, M. J. and Rivard, N. (2002). Phosphatidylinositol 3-kinase controls human intestinal epithelial cell differentiation by promoting adherens junction assembly and p38 MAPK activation. *J Biol Chem* **277**, 8226-34.

- Laprise, P., Langlois, M. J., Boucher, M. J., Jobin, C. and Rivard, N.** (2004). Down-regulation of MEK/ERK signaling by E-cadherin-dependent PI3K/Akt pathway in differentiating intestinal epithelial cells. *J Cell Physiol* **199**, 32-9.
- Laukoetter, M. G., Nava, P. and Nusrat, A.** (2008). Role of the intestinal barrier in inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol* **14**, 401-7.
- Lee, T. I., Jenner, R. G., Boyer, L. A., Guenther, M. G., Levine, S. S., Kumar, R. M., Chevalier, B., Johnstone, S. E., Cole, M. F., Isono, K. et al.** (2006). Control of developmental regulators by Polycomb in human embryonic stem cells. *Cell* **125**, 301-13.
- Lemieux, E., Boucher, M. J., Mongrain, S., Boudreau, F., Asselin, C. and Rivard, N.** (2011). Constitutive activation of the MEK/ERK pathway inhibits intestinal epithelial cell differentiation. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **301**, G719-30.
- Levy, E., Menard, D., Delvin, E., Montoudis, A., Beaulieu, J. F., Mailhot, G., Dube, N., Sinnett, D., Seidman, E. and Bendayan, M.** (2009). Localization, function and regulation of the two intestinal fatty acid-binding protein types. *Histochem Cell Biol* **132**, 351-67.
- Liu, J., Gurbur, P. B. and Kaufman, S. J.** (2008). Genetically determined proteolytic cleavage modulates alpha7beta1 integrin function. *J Biol Chem* **283**, 35668-78.
- Liu, J., Milner, D. J., Boppart, M. D., Ross, R. S. and Kaufman, S. J.** beta1D chain increases alpha7beta1 integrin and laminin and protects against sarcolemmal damage in mdx mice. *Hum Mol Genet* **21**, 1592-603.
- Lorentz, O., Duluc, I., Arcangelis, A. D., Simon-Assmann, P., Kedinger, M. and Freund, J. N.** (1997). Key role of the Cdx2 homeobox gene in extracellular matrix-mediated intestinal cell differentiation. *J Cell Biol* **139**, 1553-65.
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. and Randall, R. J.** (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* **193**, 265-75.
- Luo, B. H., Carman, C. V. and Springer, T. A.** (2007). Structural basis of integrin regulation and signaling. *Annu Rev Immunol* **25**, 619-47.
- Lussier, C., Basora, N., Bouatrouss, Y. and Beaulieu, J. F.** (2000). Integrins as mediators of epithelial cell-matrix interactions in the human small intestinal mucosa. *Microsc Res Tech* **51**, 169-78.
- Marshall, J. L., Chou, E., Oh, J., Kwok, A., Burkin, D. J. and Crosbie-Watson, R. H.** (2012). Dystrophin and utrophin expression require sarcospan: loss of alpha7 integrin exacerbates a newly discovered muscle phenotype in sarcospan-null mice. *Hum Mol Genet* **21**, 4378-93.
- Martin, P. T., Kaufman, S. J., Kramer, R. H. and Sanes, J. R.** (1996). Synaptic integrins in developing, adult, and mutant muscle: selective association of alpha1, alpha7A, and alpha7B integrins with the neuromuscular junction. *Dev Biol* **174**, 125-39.
- Matter, K. and Balda, M. S.** (2003). Signalling to and from tight junctions. *Nat Rev Mol Cell Biol* **4**, 225-36.
- Mayer, U., Saher, G., Fassler, R., Bornemann, A., Echtermeyer, F., von der Mark, H., Miosge, N., Poschl, E. and von der Mark, K.** (1997). Absence of

integrin alpha 7 causes a novel form of muscular dystrophy. *Nat Genet* **17**, 318-23.

Menard, D. (2004). Functional development of the human gastrointestinal tract: Hormone- and growth factor-mediated regulatory mechanisms. *Canadian Journal of Gastroenterology & Hepatology* **18**, 39 - 44.

Menard, D. and Beaulieu, J.-F. (1994). Human Intestinal Brush Border Membrane Hydrolases. In *Membrane Physiopathology*, vol. 159, pp. 319-341: Springer US.

Ménard, D., Beaulieu, J.-F., Boudreau, F., Perreault, N., Rivard, N. and Vachon, P. H. (2008). Gastrointestinal Tract. In *Cell Signaling and Growth Factors in Development*, pp. 755-790: Wiley-VCH Verlag GmbH.

Morgado-Diaz, J. A. and de Souza, W. (2001). Evidence that increased tyrosine phosphorylation causes disassembly of adherens junctions but does not perturb paracellular permeability in Caco-2 cells. *Tissue Cell* **33**, 500-13.

Nelson, W. J. (2003). Adaptation of core mechanisms to generate cell polarity. *Nature* **422**, 766-74.

Ni, H., Dydensborg, A. B., Herring, F. E., Basora, N., Gagne, D., Vachon, P. H. and Beaulieu, J. F. (2005). Upregulation of a functional form of the beta4 integrin subunit in colorectal cancers correlates with c-Myc expression. *Oncogene* **24**, 6820-9.

Nichols, B. L., Dudley, M. A., Nichols, V. N., Putman, M., Avery, S. E., Fraley, J. K., Quaroni, A., Shiner, M. and Carrazza, F. R. (1997). Effects of malnutrition on expression and activity of lactase in children. *Gastroenterology* **112**, 742-51.

Nishiuchi, R., Takagi, J., Hayashi, M., Ido, H., Yagi, Y., Sanzen, N., Tsuji, T., Yamada, M. and Sekiguchi, K. (2006). Ligand-binding specificities of laminin-binding integrins: a comprehensive survey of laminin-integrin interactions using recombinant alpha3beta1, alpha6beta1, alpha7beta1 and alpha6beta4 integrins. *Matrix Biol* **25**, 189-97.

Noble, J. E. and Bailey, M. J. (2009). Quantitation of protein. *Methods Enzymol* **463**, 73-95.

Nusrat, A., Parkos, C. A., Verkade, P., Foley, C. S., Liang, T. W., Innis-Whitehouse, W., Eastburn, K. K. and Madara, J. L. (2000). Tight junctions are membrane microdomains. *J Cell Sci* **113** (Pt 10), 1771-81.

Ossipova, O., Bardeesy, N., DePinho, R. A. and Green, J. B. (2003). LKB1 (XEEK1) regulates Wnt signalling in vertebrate development. *Nat Cell Biol* **5**, 889-94.

Pageot, L. P., Perreault, N., Basora, N., Francoeur, C., Magny, P. and Beaulieu, J. F. (2000). Human cell models to study small intestinal functions: recapitulation of the crypt-villus axis. *Microsc Res Tech* **49**, 394-406.

Partanen, J. I., Tervonen, T. A., Myllynen, M., Lind, E., Imai, M., Katajisto, P., Dijkgraaf, G. J., Kovanen, P. E., Makela, T. P., Werb, Z. et al. (2012). Tumor suppressor function of Liver kinase B1 (Lkb1) is linked to regulation of epithelial integrity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **109**, E388-97.

Perreault, N. and Beaulieu, J. F. (1998). Primary cultures of fully differentiated and pure human intestinal epithelial cells. *Exp Cell Res* **245**, 34-42.

- Perreault, N. and Jean-Francois, B.** (1996). Use of the dissociating enzyme thermolysin to generate viable human normal intestinal epithelial cell cultures. *Exp Cell Res* **224**, 354-64.
- Perreault, N., Vachon, P. H. and Beaulieu, J. F.** (1995). Appearance and distribution of laminin A chain isoforms and integrin alpha 2, alpha 3, alpha 6, beta 1, and beta 4 subunits in the developing human small intestinal mucosa. *Anat Rec* **242**, 242-50.
- Plow, E. F., Haas, T. A., Zhang, L., Loftus, J. and Smith, J. W.** (2000). Ligand binding to integrins. *J Biol Chem* **275**, 21785-8.
- Porter, E. M., Bevins, C. L., Ghosh, D. and Ganz, T.** (2002). The multifaceted Paneth cell. *Cell Mol Life Sci* **59**, 156-70.
- Powell, D. W., Mifflin, R. C., Valentich, J. D., Crowe, S. E., Saada, J. I. and West, A. B.** (1999). Myofibroblasts. II. Intestinal subepithelial myofibroblasts. *Am J Physiol* **277**, C183-201.
- Purcell, N. H., Darwis, D., Bueno, O. F., Muller, J. M., Schule, R. and Molkentin, J. D.** (2004). Extracellular signal-regulated kinase 2 interacts with and is negatively regulated by the LIM-only protein FHL2 in cardiomyocytes. *Mol Cell Biol* **24**, 1081-95.
- Quaroni, A. and Beaulieu, J. F.** (1997). Cell dynamics and differentiation of conditionally immortalized human intestinal epithelial cells. *Gastroenterology* **113**, 1198-213.
- Quaroni, A., Paul, E. C. and Nichols, B. L.** (1993). Intracellular degradation and reduced cell-surface expression of sucrase-isomaltase in heat-shocked Caco-2 cells. *Biochem J* **292** (Pt 3), 725-34.
- Rhoads, J. M., Argenzio, R. A., Chen, W., Rippe, R. A., Westwick, J. K., Cox, A. D., Berschneider, H. M. and Brenner, D. A.** (1997). L-glutamine stimulates intestinal cell proliferation and activates mitogen-activated protein kinases. *Am J Physiol* **272**, G943-53.
- Rivard, N., Boucher, M. J., Asselin, C. and L'Allemain, G.** (1999). MAP kinase cascade is required for p27 downregulation and S phase entry in fibroblasts and epithelial cells. *Am J Physiol* **277**, C652-64.
- Roques, S. C., Landrault, N., Teissedre, P. L., Laurent, C., Besancon, P., Rouane, J. M. and Caporiccio, B.** (2002). Hydrogen peroxide generation in caco-2 cell culture medium by addition of phenolic compounds: effect of ascorbic acid. *Free Radic Res* **36**, 593-9.
- Roy, B. C., Kohno, T., Iwakawa, R., Moriguchi, T., Kiyono, T., Morishita, K., Sanchez-Cespedes, M., Akiyama, T. and Yokota, J.** (2010). Involvement of LKB1 in epithelial-mesenchymal transition (EMT) of human lung cancer cells. *Lung Cancer* **70**, 136-45.
- Ruggiero, F., Comte, J., Cabanas, C. and Garrone, R.** (1996). Structural requirements for alpha 1 beta 1 and alpha 2 beta 1 integrin mediated cell adhesion to collagen V. *J Cell Sci* **109** (Pt 7), 1865-74.
- Sambuy, Y., De Angelis, I., Ranaldi, G., Scarino, M. L., Stammati, A. and Zucco, F.** (2005). The Caco-2 cell line as a model of the intestinal barrier: influence of cell and culture-related factors on Caco-2 cell functional characteristics. *Cell Biol Toxicol* **21**, 1-26.

- Samson, T., Smyth, N., Janetzky, S., Wendler, O., Muller, J. M., Schule, R., von der Mark, H., von der Mark, K. and Wixler, V.** (2004). The LIM-only proteins FHL2 and FHL3 interact with alpha- and beta-subunits of the muscle alpha7beta1 integrin receptor. *J Biol Chem* **279**, 28641-52.
- Sancho, E., Batlle, E. and Clevers, H.** (2003). Live and let die in the intestinal epithelium. *Curr Opin Cell Biol* **15**, 763-70.
- Sanders, M. A. and Basson, M. D.** (2000). Collagen IV-dependent ERK activation in human Caco-2 intestinal epithelial cells requires focal adhesion kinase. *J Biol Chem* **275**, 38040-7.
- Sane, A. T., Sinnett, D., Delvin, E., Bendayan, M., Marcil, V., Menard, D., Beaulieu, J. F. and Levy, E.** (2006). Localization and role of NPC1L1 in cholesterol absorption in human intestine. *J Lipid Res* **47**, 2112-20.
- Schober, S., Mielenz, D., Echtermeyer, F., Hapke, S., Poschl, E., von der Mark, H., Moch, H. and von der Mark, K.** (2000). The role of extracellular and cytoplasmic splice domains of alpha7-integrin in cell adhesion and migration on laminins. *Exp Cell Res* **255**, 303-13.
- Schwartz, M. A., Schaller, M. D. and Ginsberg, M. H.** (1995). Integrins: emerging paradigms of signal transduction. *Annu Rev Cell Dev Biol* **11**, 549-99.
- Scoville, D. H., Sato, T., He, X. C. and Li, L.** (2008). Current view: intestinal stem cells and signaling. *Gastroenterology* **134**, 849-64.
- Seltana, A., Basora, N. and Beaulieu, J. F.** (2010). Intestinal epithelial wound healing assay in an epithelial-mesenchymal co-culture system. *Wound Repair Regen* **18**, 114-22.
- Seltana, A., Basora, N. and Beaulieu, J. F.** (2011). Caco-2 Cells as an Experimental Model for the Study of Cell-Matrix Interactions and Wound Healing in Intestinal Villus Cells: Nova Science Publishers.
- Seltana, A., Guezguez, A., Lepage, M., Basora, N. and Beaulieu, J. F.** (2013). Src family kinase inhibitor PP2 accelerates differentiation in human intestinal epithelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* **430**, 1195-200.
- Seltana, A., Lepage, M. and Beaulieu, J. F.** (2012). Alteration of the Crypt Epithelial-Stromal Interface by Proinflammatory Cytokines in Crohn's Disease InTech, Chapters published
- Semenza, G.** (1986). Anchoring and biosynthesis of stalked brush border membrane proteins: glycosidases and peptidases of enterocytes and renal tubuli. *Annu Rev Cell Biol* **2**, 255-313.
- Simon-Assmann, P., Duclos, B., Orian-Rousseau, V., Arnold, C., Mathelin, C., Engvall, E. and Kedinger, M.** (1994). Differential expression of laminin isoforms and alpha 6-beta 4 integrin subunits in the developing human and mouse intestine. *Dev Dyn* **201**, 71-85.
- Simon-Assmann, P., Simo, P., Bouziges, F., Haffen, K. and Kedinger, M.** (1990). Synthesis of basement membrane proteins in the small intestine. *Digestion* **46 Suppl 2**, 12-21.
- Simoneau, A., Herring-Gillam, F. E., Vachon, P. H., Perreault, N., Basora, N., Bouatrouss, Y., Pageot, L. P., Zhou, J. and Beaulieu, J. F.** (1998). Identification, distribution, and tissular origin of the alpha5(IV) and alpha6(IV) collagen chains in the developing human intestine. *Dev Dyn* **212**, 437-47.

- Song, W. K., Wang, W., Foster, R. F., Bielser, D. A. and Kaufman, S. J.** (1992). H36-alpha 7 is a novel integrin alpha chain that is developmentally regulated during skeletal myogenesis. *J Cell Biol* **117**, 643-57.
- Song, W. K., Wang, W., Sato, H., Bielser, D. A. and Kaufman, S. J.** (1993). Expression of alpha 7 integrin cytoplasmic domains during skeletal muscle development: alternate forms, conformational change, and homologies with serine/threonine kinases and tyrosine phosphatases. *J Cell Sci* **106 (Pt 4)**, 1139-52.
- Sparmann, A. and van Lohuizen, M.** (2006). Polycomb silencers control cell fate, development and cancer. *Nat Rev Cancer* **6**, 846-56.
- Spicer, J., Rayter, S., Young, N., Elliott, R., Ashworth, A. and Smith, D.** (2003). Regulation of the Wnt signalling component PAR1A by the Peutz-Jeghers syndrome kinase LKB1. *Oncogene* **22**, 4752-6.
- Stein, J. and Kottra, G.** (1997). [Intestinal intercellular tight junctions. I. Structure and molecular mechanisms of regulation]. *Z Gastroenterol* **35**, 205-20.
- Sturm, A. and Dignass, A. U.** (2008). Epithelial restitution and wound healing in inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol* **14**, 348-53.
- Sung, U., O'Rear, J. J. and Yurchenco, P. D.** (1993). Cell and heparin binding in the distal long arm of laminin: identification of active and cryptic sites with recombinant and hybrid glycoprotein. *J Cell Biol* **123**, 1255-68.
- Takada, Y., Ye, X. and Simon, S.** (2007). The integrins. *Genome Biol* **8**, 215.
- Taniguchi, Y., Ido, H., Sanzen, N., Hayashi, M., Sato-Nishiuchi, R., Futaki, S. and Sekiguchi, K.** (2009). The C-terminal region of laminin beta chains modulates the integrin binding affinities of laminins. *J Biol Chem* **284**, 7820-31.
- Teller, I. C., Auclair, J., Herring, E., Gauthier, R., Menard, D. and Beaulieu, J. F.** (2007). Laminins in the developing and adult human small intestine: relation with the functional absorptive unit. *Dev Dyn* **236**, 1980-90.
- Teller, I. C. and Beaulieu, J. F.** (2001). Interactions between laminin and epithelial cells in intestinal health and disease. *Expert Rev Mol Med* **3**, 1-18.
- Thiery, J. P.** (2003). Cell adhesion in development: a complex signaling network. *Curr Opin Genet Dev* **13**, 365-71.
- Thomas, J. O. and Kornberg, R. D.** (1975). An octamer of histones in chromatin and free in solution. *Proc Natl Acad Sci U S A* **72**, 2626-30.
- Thompson, J. S., Saxena, S. K. and Sharp, J. G.** (2000). Regulation of intestinal regeneration: new insights. *Microsc Res Tech* **51**, 129-37.
- Tiainen, M., Vaahtomeri, K., Ylikorkala, A. and Makela, T. P.** (2002). Growth arrest by the LKB1 tumor suppressor: induction of p21(WAF1/CIP1). *Hum Mol Genet* **11**, 1497-504.
- Timpl, R., Tisi, D., Talts, J. F., Andac, Z., Sasaki, T. and Hohenester, E.** (2000). Structure and function of laminin LG modules. *Matrix Biol* **19**, 309-17.
- Traber, P. G.** (1990). Regulation of sucrase-isomaltase gene expression along the crypt-villus axis of rat small intestine. *Biochem Biophys Res Commun* **173**, 765-73.
- Tremblay, E., Auclair, J., Delvin, E., Levy, E., Menard, D., Pshezhetsky, A. V., Rivard, N., Seidman, E. G., Sinnett, D., Vachon, P. H. et al.** (2006). Gene expression profiles of normal proliferating and differentiating human intestinal

- epithelial cells: a comparison with the Caco-2 cell model. *J Cell Biochem* **99**, 1175-86.
- Tsukita, S., Furuse, M. and Itoh, M.** (2001). Multifunctional strands in tight junctions. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2**, 285-93.
- Vachon, P. H.** (2011). Integrin signaling, cell survival, and anoikis: distinctions, differences, and differentiation. *J Signal Transduct* **2011**, 738137.
- Vachon, P. H. and Beaulieu, J. F.** (1992). Transient mosaic patterns of morphological and functional differentiation in the Caco-2 cell line. *Gastroenterology* **103**, 414-23.
- Vachon, P. H. and Beaulieu, J. F.** (1995). Extracellular heterotrimeric laminin promotes differentiation in human enterocytes. *Am J Physiol* **268**, G857-67.
- Vachon, P. H., Durand, J. and Beaulieu, J. F.** (1993). Basement membrane formation and re-distribution of the beta 1 integrins in a human intestinal co-culture system. *Anat Rec* **235**, 567-76.
- Vachon, P. H., Harnois, C., Grenier, A., Dufour, G., Bouchard, V., Han, J., Landry, J., Beaulieu, J. F., Vezina, A., Dydensborg, A. B. et al.** (2002). Differentiation state-selective roles of p38 isoforms in human intestinal epithelial cell anoikis. *Gastroenterology* **123**, 1980-91.
- Vachon, P. H., Loechel, F., Xu, H., Wewer, U. M. and Engvall, E.** (1996a). Merosin and laminin in myogenesis; specific requirement for merosin in myotube stability and survival. *J Cell Biol* **134**, 1483-97.
- Vachon, P. H., Perreault, N., Magny, P. and Beaulieu, J. F.** (1996b). Uncoordinated, transient mosaic patterns of intestinal hydrolase expression in differentiating human enterocytes. *J Cell Physiol* **166**, 198-207.
- Vachon, P. H., Xu, H., Liu, L., Loechel, F., Hayashi, Y., Arahata, K., Reed, J. C., Wewer, U. M. and Engvall, E.** (1997). Integrins (alpha7beta1) in muscle function and survival. Disrupted expression in merosin-deficient congenital muscular dystrophy. *J Clin Invest* **100**, 1870-81.
- van der Flier, A. and Sonnenberg, A.** (2001). Function and interactions of integrins. *Cell Tissue Res* **305**, 285-98.
- Vasioukhin, V. and Fuchs, E.** (2001). Actin dynamics and cell-cell adhesion in epithelia. *Curr Opin Cell Biol* **13**, 76-84.
- Vignier, N., Moghadaszadeh, B., Gary, F., Beckmann, J., Mayer, U. and Guicheney, P.** (1999). Structure, genetic localization, and identification of the cardiac and skeletal muscle transcripts of the human integrin alpha7 gene (ITGA7). *Biochem Biophys Res Commun* **260**, 357-64.
- von der Mark, H., Durr, J., Sonnenberg, A., von der Mark, K., Deutzmann, R. and Goodman, S. L.** (1991). Skeletal myoblasts utilize a novel beta 1-series integrin and not alpha 6 beta 1 for binding to the E8 and T8 fragments of laminin. *J Biol Chem* **266**, 23593-601.
- von der Mark, H., Poschl, E., Lanig, H., Sasaki, T., Deutzman, R. and von der Mark, K.** (2007). Distinct acidic clusters and hydrophobic residues in the alternative splice domains X1 and X2 of alpha7 integrins define specificity for laminin isoforms. *J Mol Biol* **371**, 1188-203.
- Welser, J. V., Lange, N., Singer, C. A., Elorza, M., Scowen, P., Keef, K. D., Gerthoffer, W. T. and Burkin, D. J.** (2007). Loss of the alpha7 integrin promotes

extracellular signal-regulated kinase activation and altered vascular remodeling. *Circ Res* **101**, 672-81.

Welser, J. V., Rooney, J. E., Cohen, N. C., Gurbur, P. B., Singer, C. A., Evans, R. A., Haines, B. A. and Burkin, D. J. (2009). Myotendinous junction defects and reduced force transmission in mice that lack alpha7 integrin and utrophin. *Am J Pathol* **175**, 1545-54.

Werner, A., Willem, M., Jones, L. L., Kreutzberg, G. W., Mayer, U. and Raivich, G. (2000). Impaired axonal regeneration in alpha7 integrin-deficient mice. *J Neurosci* **20**, 1822-30.

Woods, A., Johnstone, S. R., Dickerson, K., Leiper, F. C., Fryer, L. G., Neumann, D., Schlattner, U., Wallimann, T., Carlson, M. and Carling, D. (2003). LKB1 is the upstream kinase in the AMP-activated protein kinase cascade. *Curr Biol* **13**, 2004-8.

Xiong, J. P., Stehle, T., Diefenbach, B., Zhang, R., Dunker, R., Scott, D. L., Joachimiak, A., Goodman, S. L. and Arnaout, M. A. (2001). Crystal structure of the extracellular segment of integrin alpha Vbeta3. *Science* **294**, 339-45.

Xiong, J. P., Stehle, T., Goodman, S. L. and Arnaout, M. A. (2003). New insights into the structural basis of integrin activation. *Blood* **102**, 1155-9.

Yu, C. F., Sanders, M. A. and Basson, M. D. (2000). Human caco-2 motility redistributes FAK and paxillin and activates p38 MAPK in a matrix-dependent manner. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* **278**, G952-66.

Zaidel-Bar, R., Itzkovitz, S., Ma'ayan, A., Iyengar, R. and Geiger, B. (2007). Functional atlas of the integrin adhesome. *Nat Cell Biol* **9**, 858-67.

Zent, M. B. S. a. R. (2010). Integrin Structure and Function: Springer Science.

Ziober, B. L., Vu, M. P., Waleh, N., Crawford, J., Lin, C. S. and Kramer, R. H. (1993). Alternative extracellular and cytoplasmic domains of the integrin alpha 7 subunit are differentially expressed during development. *J Biol Chem* **268**, 26773-83.

Zolkiewska, A. and Moss, J. (1995). Processing of ADP-ribosylated integrin alpha 7 in skeletal muscle myotubes. *J Biol Chem* **270**, 9227-33.

Annexes

Seltana A, Basora N and Beaulieu JF. $\alpha 7X2B\beta 1$ integrin, a negative regulator of human intestinal epithelial cells differentiation. In preparation 2014

Seltana A, Basora N, Khalfaoui T and Beaulieu JF. Fibrin(ogen): A Novel Player in the Control of Intestinal Homeostasis. In preparation 2014

Seltana A, Guezguez A, Lepage M, Basora N and Beaulieu JF. Src family kinase inhibitor PP2 accelerates differentiation in human intestinal epithelial cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2013 Jan 25; 430(4):1195-200.

Seltana A, Lepage M and Beaulieu JF. Alteration of the Crypt Epithelial-Stromal Interface by Proinflammatory Cytokines. *Crohn's Disease*. January 1, 2012

Seltana A, Basora N and Beaulieu JF. Caco-2 Cells as an Experimental Model for the Study of Cell-Matrix Interactions and Wound Healing in Intestinal Villus Cells. *Nova Science Publishers*. 2011 pp. 77-88.

Seltana A, Basora N and Beaulieu JF. Intestinal epithelial wound healing assay in an epithelial-mesenchymal co-culture system. *Wound Repair Regen*. 2010 Jan-Feb;18(1):114-22.

Francoeur C, Bouatrouss Y, **Seltana A**, Pinchuk IV, Vachon PH, Powell DW, Sawan B, Seidman EG and Beaulieu JF. Degeneration of the pericryptal myofibroblast sheath by proinflammatory cytokines in inflammatory bowel diseases. *Gastroenterology*. 2009 Jan;136(1):268-277.